

ELIANA G. DE M. LEMOS  
NELSON R. STRADIOTTO  
(ORGS.)

**CULTURA  
ACADÊMICA**  
*Editora*

# BIOENERGIA

DESENVOLVIMENTO, PESQUISA  
E INOVAÇÃO

F R O N T E I R A S



# BIOENERGIA

CONSELHO EDITORIAL ACADÊMICO  
Responsável pela publicação desta obra

Maria José Soares Mendes Giannini

Erivaldo Antônio da Silva

Kleber Tomás de Resende

Maria Valnice Boldrin

Maysa Furlan

ELIANA G. M. LEMOS  
NELSON R. STRADIOTTO  
(ORGS.)

**BIOENERGIA**  
DESENVOLVIMENTO, PESQUISA  
E INOVAÇÃO

**CULTURA  
ACADÊMICA**  
*Editora*

© 2012 Editora UNESP

**Cultura Acadêmica**

Praça da Sé, 108

01001-900 – São Paulo – SP

Tel.: (0xx11) 3242-7171

Fax: (0xx11) 3242-7172

www.editoraunesp.com.br

feu@editora.unesp.br

CIP – BRASIL. Catalogação na fonte  
Sindicato Nacional dos Editores de Livros, RJ

---

B512

Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação / Eliana G. M. Lemos e Nelson R. Stradiotto (orgs.). São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012.

il.

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7983-256-7

1. Biocombustíveis. 2. Combustíveis. 3. Energia – Fontes alternativas – Brasil.  
4. Desenvolvimento sustentável. 5. Inovações tecnológicas. I. Lemos, Eliana G. M.  
II. Stradiotto, Nelson R.

12-4488.

CDD: 662.88

CDU: 662.6

---

Este livro é publicado pelo Programa de Publicações Digitais da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

Editora afiliada:



Asociación de Editoriales Universitarias  
de América Latina y el Caribe



Associação Brasileira de  
Editoras Universitárias

# SUMÁRIO

Apresentação 9

## Parte I

Biomassa para bioenergia 13

- 1 Metabolômica de cana-de-açúcar e sua relação com a produção de biomassa vegetal para bioenergia 15
- 2 Estudos da dormência e do condicionamento fisiológico de sementes: possíveis contribuições à propagação de espécies vegetais com potencial energético 35
- 3 Tecnologia de aplicação e inovações voltadas ao uso racional de defensivos agrícolas em culturas destinadas à produção de bioenergia 53
- 4 Metagenoma e a desconstrução da biomassa 83
- 5 Modificações genéticas em plantas de cana-de-açúcar visando aumento de produtividade e a utilização de genes de *Bacillus thuringiensis* para o controle biológico de insetos praga 113
- 6 Eucalipto adensado: manejo para florestas energéticas 125

## Parte II

Produção de biocombustíveis 163

- 7 A complexidade da produção do bioetanol em fermentações abertas de matérias-primas industriais 165

## 6 SUMÁRIO

- 8 Produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 utilizando substratos não convencionais como alternativa à produção convencional 195
- 9 Hidrólise enzimática na cadeia produtiva do bioetanol e uso de enzimas para diagnósticos de produtos da fermentação 251
- 10 Resíduos agrícolas e agroindustriais: potencialidades de uso na produção de etanol 271
- 11 Utilização de enzimas lipolíticas na produção de biodiesel 319
- 12 Estressores bióticos em cana-de-açúcar: reflexos quali-quantitativos na matéria-prima e no processamento industrial 341
- 13 Produção, caracterização e utilização do biodiesel de tucumã originário da região amazônica 409
- 14 Contaminação microbiana na fermentação alcoólica para produção de etanol carburante 447

### **Parte III**

#### Utilização de bioenergia 489

- 15 Combustível renovável em trator agrícola: experiências na utilização de biodiesel 491
- 16 Efeitos da utilização do biodiesel em motores de combustão interna 521
- 17 Uso de etanol para a produção de hidrogênio e acionamento de motor aeronáutico flex 547
- 18 Uso de biogás para produção de água gelada e eletricidade 595
- 19 Biodiesel e gás de gaseificação em motor de combustão interna 633
- 20 Aspectos do incremento da cogeração no setor sucroalcooleiro com o uso de novos equipamentos e tecnologias para melhor aproveitamento energético 657

### **Parte IV**

#### Biorrefinarias, alcoolquímica e oleoquímica 751

- 21 Da biotecnologia à biorrefinaria 753

**Parte V****Sustentabilidade dos biocombustíveis 833**

- 22 Mudanças recentes na ocupação sucroalcooleira em decorrência da mecanização do corte de cana-de-açúcar no estado de São Paulo 835
- 23 Potenciais riscos ambientais do biodiesel 855
- 24 Impactos do uso de concentrado de vinhaça biodigerida e outras fontes de nutrientes nos agroecossistemas de cultivo da cana-de-açúcar 865
- 25 Avanços brasileiros no desenvolvimento de normas técnicas analíticas para certificação e controle da qualidade de biodiesel 889
- 26 Novos métodos analíticos para avaliação da qualidade do bioetanol combustível 945
- 27 Aspectos relacionados à produção de biodiesel com aproveitamento de resíduos, caracterização e testes de misturas em motores de combustão interna 981

**Lista de autores 1043**





## APRESENTAÇÃO

A bioenergia constitui atualmente um importante segmento das denominadas energias renováveis, fração cada vez mais representativa entre as matrizes energéticas de vários países do mundo. No Brasil, a pesquisa sobre bioenergia tem se desenvolvido consideravelmente, e seu uso, apontado como exemplo a ser seguido na evolução tecnológica energética da sociedade contemporânea.

Nesse contexto, a edição deste livro, intitulado *Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação*, tem por objetivo proporcionar uma visão abrangente sobre as diversas áreas que compõem este segmento, com o intuito de contribuir para melhor compreensão dessa importante energia renovável fundamental para o desenvolvimento do país.

Este livro apresenta uma coletânea de trabalhos realizados por vários pesquisadores do Instituto de Pesquisa em Bioenergia (Bioen) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (Unesp). Essas pesquisas foram agrupadas em cinco partes distintas, perfazendo um total de vinte e sete capítulos.

Na primeira parte são mostradas as várias formas de biomassa utilizadas na obtenção de bioenergia; na segunda, os diversos processos usados na produção de biocombustíveis; na terceira, as aplicações dos bicombustíveis em motores; na quarta, os aspectos concernentes às biorrefinaria, alcoolquímica e oleoquímica; e na última, os impactos ambientais, sociais e econômicos da sustentabilidade dos bicombustíveis.

Na primeira parte intitulada “Biomassa para bioenergia” são aportados, em seis capítulos, temas da maior relevância acadêmica, tais como: a metabólica de cana-de-açúcar e sua relação com a produção de biomassa vegetal para bioenergia; os estudos da dormência e do condicionamento fisiológico de sementes e as possíveis contribuições à propagação de espécies vegetais com potencial energético; a tecnologia de aplicação e as inovações voltadas ao uso racional de defensivos agrícolas em culturas destinadas à produção de bioenergia; o metagenoma e a desconstrução da biomassa; as modificações genéticas em plantas de cana-de-açúcar visando ao aumento de produtividade e à utilização de genes de *Bacillus thuringiensis* para o controle biológico de insetos praga; e o uso do eucalipto adensado no manejo de florestas energéticas.

Na segunda parte intitulada “Produção de biocombustíveis” são descritos em oito capítulos tópicos da maior envergadura científica, como: a produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, utilizando substratos não convencionais como alternativa à produção convencional; a hidrólise enzimática na cadeia produtiva do bioetanol e o uso de enzimas para diagnósticos de produtos da fermentação; a utilização de enzimas lipolíticas na produção de biodiesel; os resíduos agrícolas e agroindustriais e as potencialidades de uso na produção de etanol; a complexidade da produção do bioetanol em fermentações abertas de matérias-primas industriais; os estressores bióticos em cana-de-açúcar e seus reflexos quali-quantitativos na matéria-prima e no processamento industrial; a produção, caracterização e utilização do biodiesel de tucumã originário da região amazônica; e a contaminação microbiana na fermentação alcoólica para produção de etanol carburante.

Na terceira parte intitulada “Utilização de bioenergia” são relatados em seis capítulos temas da mais alta importância tecnológica, tais como: o uso de combustível renovável em trator agrícola e as experiências na utilização de biodiesel; os efeitos da utilização do biodiesel em motores de combustão interna; o uso de etanol para a produção de hidrogênio e acionamento de motor aeronáutico flex; o uso de biogás para produção de água gelada e eletricidade; o biodiesel e o gás de gaseificação em motor de combustão interna; e os aspectos do incremento da cogeração no setor sucroalcooleiro com o uso de novos equipamentos e tecnologias para melhor aproveitamento energético.

Na quarta parte intitulada “Biorrefinarias, álcoolquímica e oleoquímica” são discutidos dentro de um único capítulo tópicos altamente relevantes para o desenvolvimento industrial, tais como: a evolução da biotecnologia à biorrefinaria, em que são relatadas importantes aplicações em biotecnologia e recentes desenvolvimentos de tecnologias de bioprocessamento para utilização de biomassa com foco principal na bioconversão industrial das fontes renováveis em químicos de interesse.

Na quinta parte intitulada “Sustentabilidade dos biocombustíveis” são abordados em seis capítulos temas extremamente vitais para a sociedade, como: as mudanças recentes na ocupação sucroalcooleira em decorrência da mecanização do corte de cana-de-açúcar no estado de São Paulo; os potenciais riscos ambientais do biodiesel; os impactos do uso de concentrado de vinhaça biodigerida e outras fontes de nutrientes nos agroecossistemas de cultivo da cana-de-açúcar; os avanços brasileiros no desenvolvimento de normas técnicas analíticas para certificação e controle da qualidade de biodiesel; os novos métodos analíticos para avaliação da qualidade do bioetanol combustível; e os aspectos relacionados à produção de biodiesel com aproveitamento de resíduos, caracterização e testes de misturas em motores de combustão interna.

Concluindo, gostaríamos de agradecer imensamente aos autores dos capítulos pela inestimável contribuição; à professora Maria José Soares Mendes Giannini pelo convite para organizarmos a edição deste livro; aos revisores dos capítulos pelas correções altamente qualificadas; à Neusa Maria Luiz pelos excelentes serviços de secretaria; à Pró-Reitoria de Pesquisa da Unesp pela oportunidade proporcionada pelo Programa de Publicações Digitais; e à Editora da Unesp pela esmerada produção desta obra.

*Eliana G. M. Lemos*

*Nelson R. Stradiotto*



## **Parte I**

# Biomassa para bioenergia



# 1

## Metabolômica de cana-de-açúcar e sua relação com a produção de biomassa vegetal para bioenergia

*Alberto J. Cavalheiro, Isabel Duarte Coutinho,  
Gabriel Mazzi Leme, Alexander Alves da Silva,  
Ana Paula Dias da Silva*

A produção de biocombustíveis tem recebido atenção crescente, vislumbrados como fontes biodegradáveis e não poluentes de energia. Merecem ênfase o diesel e o etanol obtidos de fontes vegetais, com destaque para este último, já produzido em vários países a partir da fermentação da sacarose obtida, em ordem de importância, de cana-de-açúcar, milho, sorgo e beterraba. A produção a partir da cana-de-açúcar desenvolveu-se de forma impressionante no Brasil, a ponto de se tornar uma cultura agrícola de importância estratégica para a economia nacional.

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae, tribo Andropogoneae e ao gênero *Saccharum*, destacando-se a espécie *Saccharum officinarum*, originária do sudeste asiático, onde é cultivada desde tempos remotos. Cruzamentos dessa espécie com outras quatro do mesmo gênero permitiram o desenvolvimento de diversas variedades, com o objetivo de obter plantas com características agrônomicas melhoradas, incluindo resistência a doenças. Variedades modernas de cana-de-açúcar são derivadas principalmente de cruzamento interespecífico entre a cana nobre *S. officinarum* e a espécie selvagem *S. spontaneum*. Como resultado disso, as variedades atuais de cana possuem um genoma interespecífico complexo, aneupoliploide ( $n \approx 12$ ), com o número de cromossomos variando de 100 a 130 (Hoarau et al., 2001). Essa complexidade genômica e a natureza multialélica e multigênica da maioria das variedades agrônomicas torna o melhoramento da cana-de-açúcar uma



tarefa muito difícil (Casu et al., 2004). Os gêneros *Saccharum*, *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerostachya* são considerados muito similares e formam o “complexo *Saccharum*” (Mukherjee, 1957), cujas espécies são passíveis de inter cruzamento forçado em programas de melhoramento genético.

## Por que estudar metabolômica de cana-de-açúcar?

O crescimento e ciclo de vida das plantas envolvem sequências complexas de expressão gênica altamente controladas, além de respostas e adaptações ao meio ambiente, no qual estão sujeitas a várias situações de estresses bióticos e abióticos que podem modificar essa expressão. A maior parte dos progressos no entendimento desses processos em vegetais foi obtido a partir de estudos em espécies modelo, principalmente com *Arabidopsis* e arroz. Embora o impacto da poliploidia sobre a expressão gênica tenha sido estudado em várias espécies alopoliploides (algodão e *Arabidopsis* – tetraploides, trigo e *Senécio* – hexaploides), com relatos de efeitos aditivos e não aditivos sobre subconjuntos de genes, observados juntamente com a poliploidização (Jackson; Chen, 2010), estudos ômicos com cana-de-açúcar podem proporcionar descobertas importantes acerca da regulação gênica em genomas complexos (Manners; Casu, 2011).

Metabolômica estuda os processos ecofisiológicos no nível micromolecular, monitorando o maior número possível de metabólitos primários e secundários de células, órgãos e tecidos de um organismo por meio de técnicas analíticas de alto desempenho como cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de ultravioleta e visível com arranjo de diodos e/ou espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM) e espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) acoplado ou não a um cromatógrafo líquido. Resulta, portanto, na caracterização de fenótipos micromoleculares de organismos sob condições específicas (fatores ambientais, genéticos e patológicos), visando a associação dessas substâncias ao genótipo e à função gênica (Villas-Bôas; Rasmussen; Lane, 2005).

Ao conjunto de dados gerados, aplica-se tratamento quimiométrico visando correlacionar as informações químicas às características vegetais observadas no experimento para, a seguir, proceder-se à formulação de hi-

póteses. Trata-se de abordagem complementar à genômica e à proteômica, no sentido do entendimento dinâmico e funcional de organismos no nível micromolecular. Esse conhecimento detalhado de espécies úteis para a produção de bioenergia tem aplicação potencial no melhoramento do rendimento de biomassa, teor de moléculas diretamente relacionadas à produção de energia e manipulação molecular da maquinaria bioquímica para estabelecimento de cultivares mais resistentes a situações de estresses bióticos e abióticos, e também mais produtivos.

## Constituição micromolecular de cana-de-açúcar

Apesar da produção de sacarose a partir da cana-de-açúcar remontar à época do Império Gupta, por volta do ano 350, na Índia, sua estrutura molecular só foi elucidada em 1927 (Avery; Haworth; Hirst, 1927), após estudos intensivos de vários cientistas por cerca de três décadas. Relatos sobre outros constituintes químicos micromoleculares desse vegetal só aparecem na literatura científica a partir da década de 1930. Burr e colaboradores publicaram, em 1957, uma revisão interessante sobre vários aspectos da cana-de-açúcar, incluindo o que era conhecido à época sobre sua constituição química. Em relação às micromoléculas, são citados, nessa revisão, estudos que relataram a ocorrência de pirogalol, ácido protocatecuico e vanilina na fração lignínica; vitamina A, inositol, fitina e os ácidos aconítico, cítrico, fumárico, glicólico, málico, mesacônico, oxálico, succínico, siríngico e ascórbico na garapa; tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, niacina e biotina nos colmos; ácido fólico no melaço; piridoxina e ácido ascórbico nas folhas.

Da graxa exterior dos colmos foram obtidos álcool miricílico e hidrocarbonetos. Ácidos palmítico e linoleico, estigmasterol, sitostetol, glicerol, clorofila e caroteno foram obtidos de extratos da planta. Entre os compostos fosforados, até 1957 já haviam sido identificados em cana-de-açúcar frutose difosfato, glicose-1-P, glicose-6-P, adenosina trifosfato, ácido fosfomálico e ácido glicérico-3-P. Entre os aminoácidos, asparagina era frequentemente encontrada em grande quantidade no melaço, mas também já haviam sido relatadas as ocorrências de ácido aspártico e glutâmico, lisina, alanina, valina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, leucina, isoleucina, glicina, serina, glutamina, fenilalanina, norleucina, tirosina, cisteína, metionina, norvalina, ácido  $\alpha$ -amino isobutírico, prolina e treonina.

Investigações preliminares sobre a ocorrência de substâncias fenólicas em cana-de-açúcar foram feitas por Stevens (1959), que não conseguiu confirmar as presenças de ácidos ferúlico e cafeico na garapa, mas verificou na cutícula do vegetal (B 37-161) a presença de pigmento cuja aglicona apresentou características similares à cianidina. A ocorrência de antocininas em cana já havia sido proposta por Sakuma e Momose, em 1935.

No bagaço de cana foram determinados vários compostos fenólicos: ácido *p*-coumárico, ácido ferulico, *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido vanílico (Leal et al., 1994). Um estudo amplo sobre a composição química no complexo *Saccharum* envolveu a investigação de 120 plantas dos gêneros *Saccharum*, *Erianthus*, *Ripidium*, *Miscanthus*, *Narenga*, *Sclerostachya*, *Imperata*, incluindo híbridos interespecíficos e intergenéricos e variedades comerciais de cana (Williams; Harborne; Smith, 1974). Como principal resultado, o estudo indica as flavonas de folhas como potenciais marcadores sistemáticos, acrescentando que *Saccharum officinarum*, *S. edule*, *S. robustum* e *Erianthus maximus* podem ser facilmente distinguidos de *S. spontaneum*, *Narenga*, *Miscanthus*, *Imperata*, *Sclerostachya*, *Ripidium* e outras espécies de *Erianthus* pela presença de bissulfatos de tricina-7-*O*-glicosídeo e tricina-7-*O*-neohesperidósido e tricina-7-*O*-diglicosídeo.

Também foi observado nesse estudo que as espécies de *Erianthus*, todas africanas, podem ser distinguidas de *Ripidium*, que ocorrem nas Américas, pela presença de uma luteolina di-*C*-glicosídeo apenas neste último gênero. Embora com a identificação incompleta de várias substâncias, outras flavonas *C*- e *O*-glicosídeos foram encontradas em todos os gêneros estudados: iso-orientina, iso-vitexina, iso-orientina-*O*-raminosilglicosídeo, iso-orientina 7-*O*-glicosídeo, uma possível iso-orientina *O*-triglicosídeo e três luteolina di-*C*-glicosídeos. Os autores observaram também que alguns híbridos F1 de *Saccharum officinarum*  $\times$  *S. spontaneum* apresentaram alteração no padrão de hidroxilação do anel B das flavonas, principalmente em relação aos derivados de iso-orientina, além de vitexinas *C*-glicosídeos. Os híbridos apresentaram maior teor de vitexina *C*-glicosídeos (uma hidroxila), enquanto as matrizes apresentaram principalmente luteolina *C*-glicosídeos (duas hidroxilas no anel B).

A partir de 2005, surgiram novos trabalhos de caracterização de flavonas de folhas de plantas híbridas, transgênicas e em garapa a partir de cultivares brasileiros de cana-de-açúcar, porém, empregando técnicas mais refinadas,

como CLAE-DAD-EM. Nesses estudos, várias flavonas *O* e *C*-glicosiladas foram descritas, incluindo diosmetina-8-*C*-glicosil-arabinosídeo, diosmetina-8-*C*-glicosídeo, tricina-7-*O*-ramnosilgalacturonídeo, tricina-4'-*O*-(*eritro* ou *treo*-guaiaicilgliceril) éter e tricina-4'-*O*-(*eritro* ou *treo*-guaiaicilgliceril) éter-7-*O*-glicopiranosídeo, tricina-7-*O*-ramnosil-galacturonídeo, tricina-7-*O*-neohesperosídeo, tricina-7-*O*-neohesperosídeo-4'-*O*-ramnosídeo, tricina-7-*O*-metilglicuronídeo, orientina, vitexina, luteolina-8-*C*-ramnosil-glicosídeo, 4',5'-dimetil-luteolina-8-*C*-glicosídeo, luteolina-8-*C*-glicosil-7-*O*-glicuronídeo, escaftosídeo, iso-escaftosídeo e 7-*O*-metilapigenina-6-*C*-glicosídeo (Colombo et al., 2005; Colombo et al., 2006; Colombo; Yariwake; McCullaghb, 2008; Vila et al., 2008; Colombo et al., 2009).

A ação antiproliferativa e antioxidante observada por Duarte-Almeida e colaboradores (2006 e 2007) na garapa obtida de cana-de-açúcar (cultivar SP813250) foi atribuída aos constituintes fenólicos apigenina, luteolina, ácido cafeico, ácido hidroxicinâmico e ácido sinápico, além de tricina-7-*O*- $\beta$ -(6''-metoxicinâmil)-glicosídeo.

As flavonas luteolina-8-*C*-ramnosil-glicosídeo, tricina-7-*O*-ramnosilgalacturonídeo, diosmina e as antocianinas petunidina-3-*O*-(6''-succinil)-raminosídeo e cianidina-3-*O*-glicosídeo foram identificadas e quantificadas nas folhas, colmos e raízes de *Saccharum sinensis* Roxb (Li et al., 2010).

A composição química de *kokuto*, um tipo de açúcar bruto similar à rapadura e preparado no Japão e região a partir da cana-de-açúcar, foi estudada, resultando na descrição de vários compostos fenólicos, muitos com propriedades antioxidantes. Várias lignanas estão entre eles (Nakasone et al., 1996; Takara et al., 2002 e 2003). Nas figuras 1.2 e 1.3 estão ilustradas várias dessas substâncias.

Arundoína (fernenol metil éter) e taraxerol metil éter (savamiletina) foram os primeiros triterpenos a serem relatados nas folhas de *Saccharum officinarum* L. (Bryce et al., 1967). Posteriormente, foram caracterizados  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e os compostos minoritários taraxerol,  $\beta$ -amirina, betulina,  $\beta$ -amirina metil éter (iso-savamiletina), fernenol, cilindrina, 24-metil-lofenol, 24-etil-lofenol, estigmasten-5-en-3 $\beta$ -diol (ikshusterol), estigmasten-5-en-3 $\beta$ -diol (epi-ikshusterol) e estigmastan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol (Deshmane; Dev, 1971). Os triterpenos e esteroides campesterol;  $\beta$ -sitosterol; estigmasterol; 24-metilcolesta-3,6-diona; 24-etilcolesta-

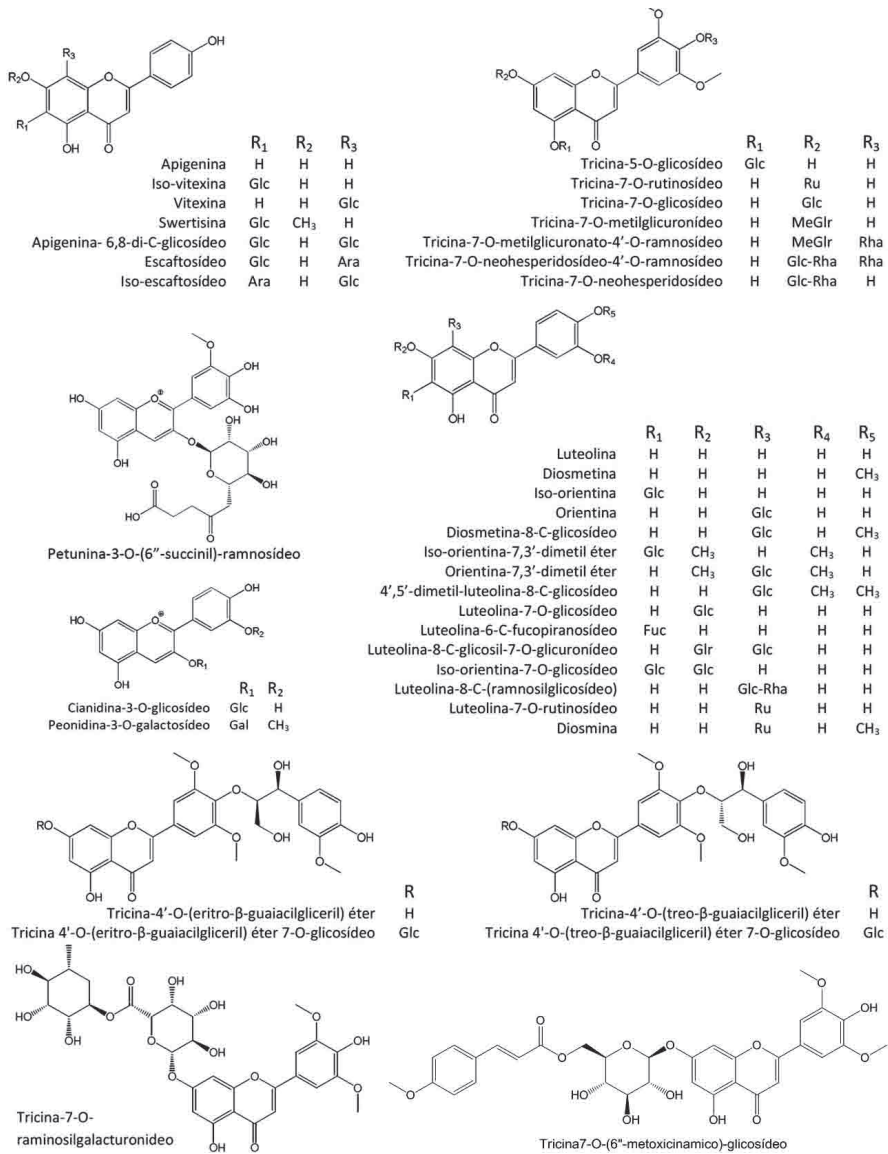


Figura 1.1 – Flavonas e antocianinas já identificadas em estudos químicos com *Saccharum* spp. Ara = arabose, Fuc = fucose, Gal = galactose, Glc = glicose, Glr = ácido glicurônico, MeGlr = metil éster do ácido glicurônico e Rha = ramnose, Ru = rutinosídeo.

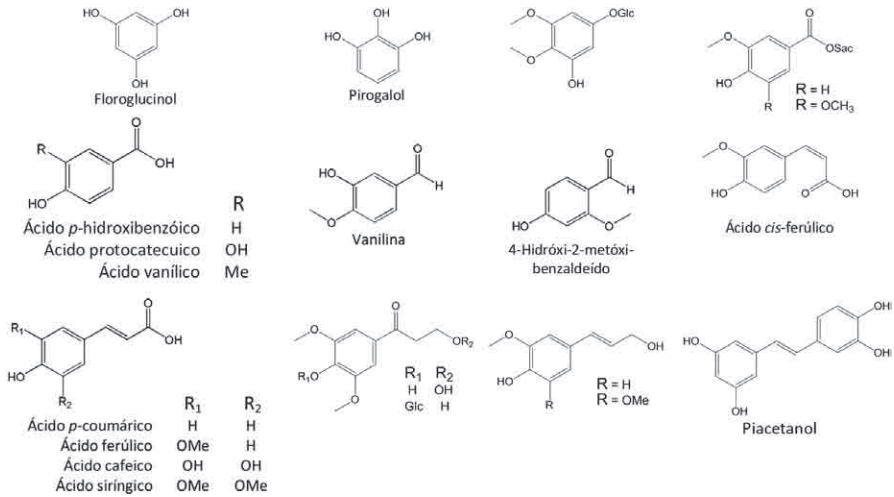


Figura 1.2 – Compostos fenólicos e estilbenos já identificados em amostras de *Saccharum* spp. ou em produtos obtidos a partir da planta.

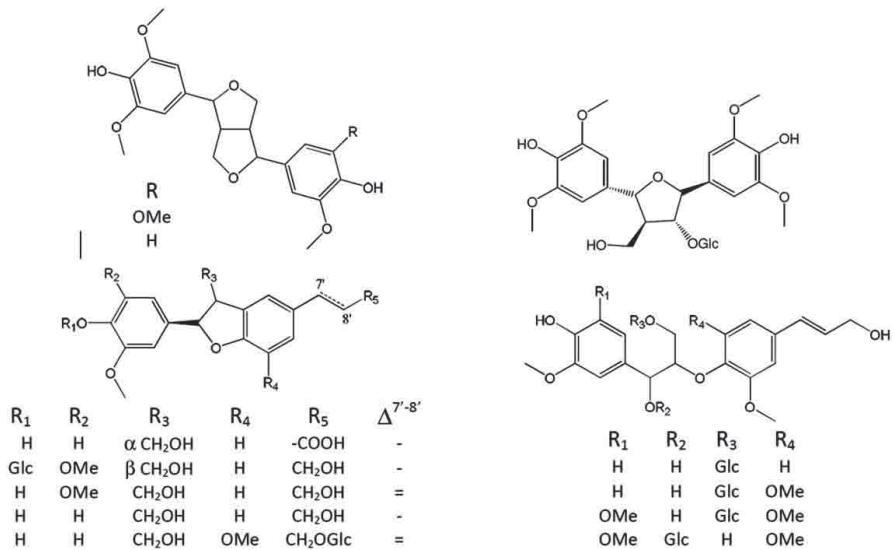


Figura 1.3 – Lignanas já identificadas como constituintes de “kokuto”, alimento preparado no Japão a partir de caldo de cana.

-3,6-diona; 24-etilcolest-22-en-3,6-diona; 6-hidroxi-campest-4-en-3-ona; 6-hidroxiestigmast-4,22-dien-3-ona; colest-4-en-3-ona; 24-metilcolest-4-en-3-ona; 24-metilcolest-4,22-dien-3-ona; 24-etilcolest-4-en-3-ona e 24-etilcolest-4,22-dien-3-ona foram isolados da torta de filtro da cana-de-açúcar (Georges et al., 2006). A torta de filtro é um resíduo obtido na fabricação do açúcar, depois que as borras resultantes da clarificação têm a sacarose residual extraída, e tem sido empregada como adubação orgânica (Pereira et al., 2005). As estruturas dessas substâncias estão representadas nas figuras 1.4 e 1.5.

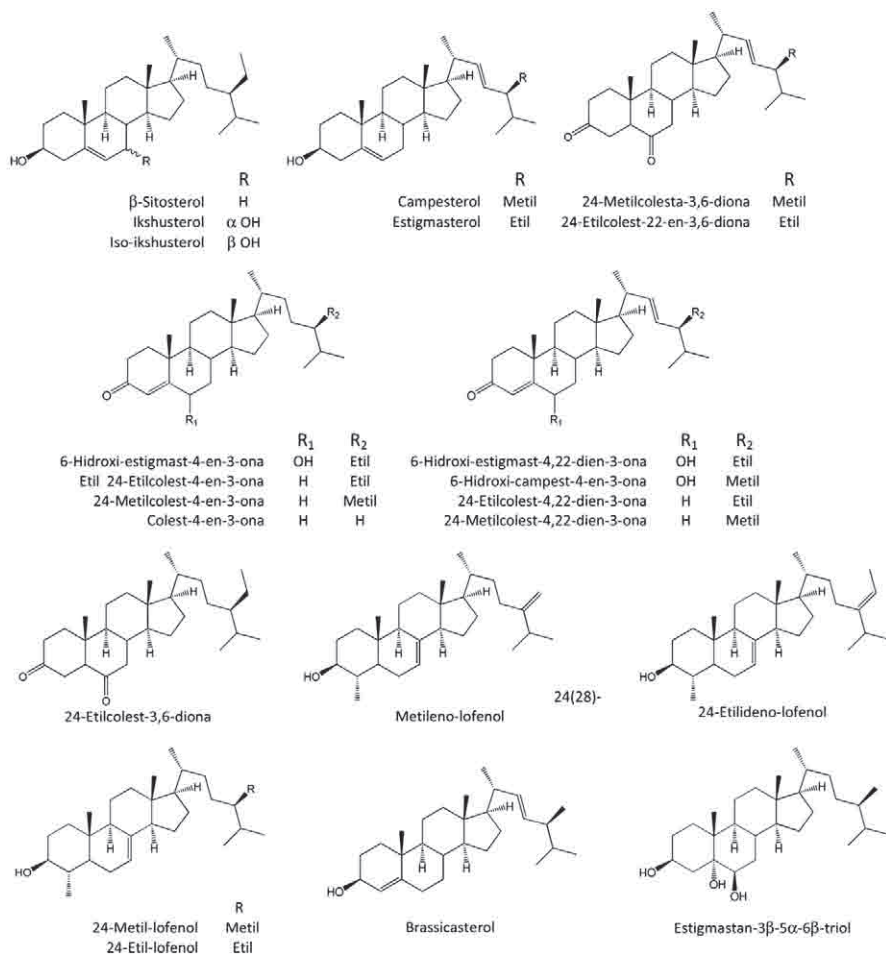


Figura 1.4 – Esteroides identificados em estudos químicos de *Saccharum* spp.

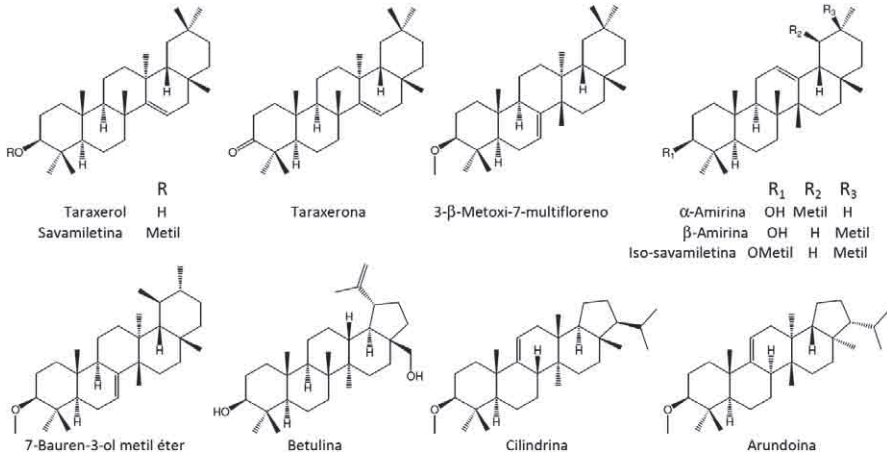


Figura 1.5 – Triterpenos identificados em estudos químicos de *Saccharum* spp.

## Constituição micromolecular associada a eventos ecofisiológicos

Os trabalhos citados acima descrevem apenas o isolamento e caracterização estrutural desses compostos obtidos de diferentes partes e híbridos de *Saccharum* spp., e também de produtos e subprodutos oriundos do processamento do vegetal. Nesses casos, é importante ressaltar que muitas dessas substâncias podem ser resultado de hidrólise, rearranjos e isomerizações causadas pelos processos térmicos e alcalinos envolvidos na preparação de melaço, rapadura e *kokuto*, principalmente.

A seguir estão revisados alguns estudos que relacionam metabólitos de cana-de-açúcar a processos ecofisiológicos. Nesses estudos, são avaliados grupos específicos de metabólitos (em alguns casos uma substância apenas) e que podem ser considerados estudos preliminares à abordagem metabolômica.

Os primeiros trabalhos relacionando alterações na constituição química de cana-de-açúcar com situações de estresse associaram floroglucinol (1,3,5-triidroxibenzeno) ao cultivo sob deficiência de potássio (Hartt, 1934) e o aumento expressivo do teor de aminoácidos quando cana foi submetida à seca (Wiggins; Williams, 1955).



O ácido hidroxâmico 2,4-diidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona (DIBOA), obtido de folhas de cana-de-açúcar, e seu produto de degradação 2-benzoxazolinona (BOA) possuem efeitos alelopáticos (Singh; Suman; Shrivastava, 2003). A aplicação dessa substância em concentrações maiores que 0,3 mM inibiu o crescimento da cana-de-açúcar e, em concentrações superiores, mostrou ação alelopática no desenvolvimento do trigo, mostarda e feijão (Pushpa et al., 2009). Ensaios de alelopatia também foram realizados com extratos da palha de cana-de-açúcar. A partir do fracionamento do extrato, foram isolados e quantificados os ácidos *trans*-ferulico, *cis*-ferulico, vanílico e siringico (Sampietro; Vattuone; Isla, 2006), que inibiram o crescimento de ervas daninhas (*Amaranthus quitensis* L., *Bidens subalternans* L., *Brassica campestris* L., *Sida rhombifolia* L.) e de *Lactuca sativa* L. (alface).

Piceatanol (Figura 1.3) foi isolado e caracterizado a partir do extrato clorofórmico dos colmos de *Saccharum* sp. (cvs. CP807, C 33-324, e CP36-13). Esse estilbeno foi biossintetizado pela planta quando inoculada com o fungo *Colletotrichum falcatum*, conhecido como podridão vermelha (Brinker; Seigler, 1991), sendo caracterizado como fitoalexina. Estilbenos como o piceatanol, resveratrol e pinosilvina foram também identificados em outras espécies de Poaceae quando infectadas com fungos endofíticos (Powell et al., 1994). As fitoalexinas são substâncias produzidas pelo vegetal como resposta a presença de patógenos invasores.

França et al. (2001) usaram um conjunto de genes relacionados ao metabolismo secundário, extraído do banco de sequências *tag* expressas pela cana (SUCEST). O objetivo desse estudo foi investigar tanto o padrão de expressão gênica de enzimas chaves reguladoras das vias do metabolismo secundário e das classes principais de metabólitos envolvidos na resposta da cana-de-açúcar a desafios ambientais e durante seu desenvolvimento. Os resultados mostraram que cDNAs de cana-de-açúcar codificam sesquiterpeno ciclases (SC) induzidos por luz UV, assim como chalcona sintase (CHS), a primeira enzima na ramificação metabólica que leva a flavonoides, isoflavona sintase (IFS), que está envolvida na defesa da planta e nodulação da raiz, isoflavona redutase (IFR), uma enzima chave na biossíntese de fitoalexinas fenilpropanoídicas e ácido cafeico-*O*-metiltransferase, enzima chave na biossíntese de lignina e precursores de parede celular.

Metabólitos secundários são sintetizados a partir de intermediários do metabolismo primário do carbono. Considera-se que a síntese aumentada

desses metabólitos sob condições de estresse estão relacionadas à proteção das estruturas celulares de danos oxidativos (Chalker-Scott; Fuchigami, 1989; Close; McArthur, 2002; Winkel-Shirley, 2002; Wahid; Ghazanfar, 2006). Carotenoides (carotenos e xantofilas) atuam como pigmentos acessórios na captação de luz e também como antioxidantes (Havaux, 1998; de Pascale et al., 2001). Os compostos fenólicos são antioxidantes poderosos, importantes na proteção de tecidos sob estresse (Dixon; Paiva, 1995; Sgherri, Stevanovic; Navari-izzo, 2004). Eles são quimicamente heterogêneos, incluindo flavonoides, ligninas e taninos. Desempenham ampla variedade de funções, incluindo defesa contra herbívoros e patógenos, suporte mecânico, atração de polinizadores, absorção de luz e ação inibitória sobre plantas vizinhas competidoras (Harborne; Williams, 2000; Taiz; Zeiger; 2002).

Recentemente, o papel dos fenólicos foi revisado devido às evidências de seu maior envolvimento na tolerância ao estresse oxidativo do que na defesa contra herbivoria (Close; McArthur, 2002; Wahid; Ghazanfar, 2006). Antocianinas são solúveis em água e produzidas sob várias condições de estresse, incluindo UV-B (Mendez; Jones; Manetas, 1999), seca (Balakumar et al., 1993), baixa temperatura (Krol et al., 1995), deficiência de nutrientes (Rajendran et al., 1992), ozônio (Foot et al., 1996) e salinidade (Wahid; Ghazanfar, 2006). O acúmulo desses metabólitos sob condições de estresse merece estudos avançados.

Kumar e Narayanaswamy (2006) tentaram relacionar níveis de ácidos carboxílicos,  $\alpha$ -hidroxí ácidos e amino ácidos com o desenvolvimento da podridão vermelha. Poliamidas foram identificadas em garapa (Rodríguez et al., 2000). Ropenack e colaboradores (1998) relacionaram o aumento nos níveis de poliaminas e ácidos fenólicos em tecidos vegetais com a diminuição na eficiência da infestação fúngica e viral, incluindo inibição da germinação de esporos de fungos e reforço da parede celular vegetal, tornando-as mais resistentes à ação de enzimas hidrolíticas.

A maioria dos ácidos fenólicos, como os derivados do ácido cinâmico, estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são reconhecidos como participantes constitutivos (antecipinas) nas interações planta-patógeno. No entanto, há relatos do aumento da atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) após a infecção do vegetal por patógenos e a caracterização de hidroxicinamoilamidas como fitoalexinas, biossintetizadas em resposta ao ataque de patógenos (Matern; Grimmig; Kneusel, 1995).

Fontaniella et al. (2003) avaliaram os teores das poliaminas putresceína, cadaverina, espermidina e espermina e dos ácidos *p*-hidroxibenzoico, clorogênico, cafeico, siríngico, *p*-coumárico e ferúlico em dois cultivares de cana-de-açúcar (L55-5 e C439-52) com susceptibilidades diferentes em relação à escaldadura das folhas, uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*. Foram avaliados os sucos obtidos de dois cultivares infectados, que apresentaram níveis significativamente aumentados de atividade de putresceína e ornitina descarboxilase. No entanto, os patógenos induziram mudanças diferentes nos dois cultivares, em etapas metabólicas subsequentes. Enquanto espermidina desapareceu completamente no cultivar altamente susceptível C 439-52, um aumento no teor dessa substância foi observado no cultivar moderadamente susceptível L 55-5. O metabolismo de ácidos fenólicos também foi diferente nos dois cultivares. Em resumo, esse estudo demonstrou que a composição de poliaminas e ácidos fenólicos no suco da cana foi alterada de forma diferenciada pela infecção por *X. albilineans*, sendo que essas alterações também são cultivar dependentes.

Dimetilsulfoniopropionato (DMSP), glicina betaína e prolina betaína já foram encontradas e quantificadas em cana (Colmer et al., 2000). Essas substâncias possuem propriedades osmoprotetoras geralmente relacionadas a situações de estresse salino e hídrico (seca), fundamentais na estabilização conformacional de proteínas e membranas.

Glassop e colaboradores (2007) observaram mudanças metabólicas durante o desenvolvimento da planta (cultivar Q-117) através de análises do perfil metabólico de internodos em vários estágios de desenvolvimento, ao longo dos colmos, por CG-EM. Verificaram que os teores de trealose e de sacarose foram positivamente correlacionados, embora desconheçam mecanismo para explicar essa correlação. No entanto, existem relatos que indicam modulação por trealose da atividade hexoquinase, enzima associada ao desenvolvimento vegetal (Rolland; Baena-Gonzalez; Sheen, 2006; Zhang; Yang; Feng, 2006). Existem também relatos que associam o acúmulo de trealose em plantas submetidas a estresses hídrico, salino e térmico (Müller; Boller; Wiemken, 1995). Polióis, como manitol, xilitol e sorbitol, são considerados osmoreguladores e associados a estresse osmótico causado por temperatura, seca, sal e altos teores de açúcar (Bialeski, 1982; Pommerrenig; Papini-Terzi; Sauer, 2007).

De forma mais ampla, várias associações entre níveis de açúcares e expressão gênica já foram relatadas. Mais especificamente, os açúcares palatinose, turanose, celobiose, gentiobiose, lactilose e leucrose foram relacionados à supressão de sinalização de giberelinas em embriões de cevada (Loreti; Alpi; Perata, 2000). Além de sacarose, o mais abundante em cana-de-açúcar, glicose e frutose estão sempre presentes em baixas concentrações. Adicionalmente, outros 32 açúcares solúveis foram detectados em concentrações mínimas em várias espécies e híbridos do complexo *Saccharum* (Glassop et al. 2010). O eventual papel dessas substâncias na modulação de sinais fisiológicos, incluindo crescimento vegetal e resposta a estresses, ainda não é entendido.

Wahid e Ghazanfar (2006) encontram fortes evidências para a hipótese de que os metabólitos secundários desempenham papel fisiológico na tolerância à salinidade pela cana-de-açúcar, particularmente em relação aos danos oxidativos. A função de tais metabólitos pode ficar restrita aos compartimentos em que são acumulados, como carotenoides em cloroplastos e fenólicos, antocianinas e flavonas no citosol.

O aumento na temperatura ambiente global é outro fator crítico para o crescimento vegetal. Para estudar alterações no crescimento vegetal e nos níveis de metabólitos primários e secundários, e suas relações com termotolerância, mudas de cana-de-açúcar (NCO-310) de um mês de idade foram cultivadas sob condições controle (28°C) e sob estresse térmico (40°C) e avaliadas em intervalos de doze horas. Inicialmente, o estresse térmico reduziu significativamente a matéria seca e a área foliar das plântulas, mas esse efeito foi posteriormente reduzido. Alterações nas taxas de crescimento relativo e na assimilação líquida de água foram maiores que a expansão foliar relativa, indicando um efeito adverso do calor sobre a assimilação de nutrientes e de CO<sub>2</sub> na produção de matéria seca.

Embora a redução no potencial hídrico foliar tenha sido uma resposta imediata ao calor, esse efeito foi compensando pela síntese prematura de prolina livre, glicina betaína e açúcares solúveis. Entre os metabólitos secundários, a síntese de antocianinas foi similar à de metabólitos primários; carotenoides e fenólicos solúveis acumularam posteriormente, enquanto o teor de clorofila não sofreu alteração. As relações entre níveis de atributos de crescimento e níveis metabólicos, não observados nos controles, foram

evidentes nas condições de estresse térmico, indicando sua importância na tolerância da cana-de-açúcar ao calor (Wahid, 2007).

Além dos metabólitos destacados nos estudos citados acima, os compostos orgânicos voláteis biogênicos (BVOCs) liberados por plantas e que incluem terpenoides, hidrocarbonetos não oxigenados e oxigenados (álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres) desempenham função importante na sinalização vegetal, incluindo atração de polinizadores espécie-específicos, defesa a herbívoros e patógenos (por exemplo, através da atração de seus inimigos naturais), regulação celular no desenvolvimento vegetal e, de uma maneira geral, também podem ser indicadores da condição fisiológica do vegetal em condições de estresse (Farmer, 2001; Pechersky. Gershenzon; 2002; Penuela; Ilusia, 2003). Outro fato significativo é que BVOCs desempenham também papel importante na qualidade do ar, na formação do aerossol orgânico secundário (SOA), no sequestro de carbono e nas interações biosféricas (Atkinson; Arey, 2003).

Quase nada de BVOCs de cana-de-açúcar é conhecido. Uma exceção foi a caracterização dos componentes voláteis (Figura 1.6) responsáveis pelo aroma do suco fresco de cana-de-açúcar (variedade NCO 376), entre os quais foram identificados os ácidos hexanoico, heptanoico e nonanoico, os álcoois benzílico, 2-feniletanol, 3-fenil-1-propanol e 3-fenil-2-propanol, os fenóis 2-metoxifenol, fenol, 4-hidroxi-3-metoxiestireno, 4-vinilfenol e 4-hidroxi-2-metóxi-benzaldeído e a lactona 4-nonanolido (Tokitomo; Kobayashi; Yamanishi, 1984). As substâncias voláteis 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona (sotolona), 3-hidróxi-2-metil-4-piranona e 2-hidróxi-3-metil-2-ciclopentenona, relacionadas ao aroma do melão, não foram detectadas no suco fresco, o que é indicativo de que são produzidas durante o processamento do suco, em condições alcalinas e sob alta temperatura.

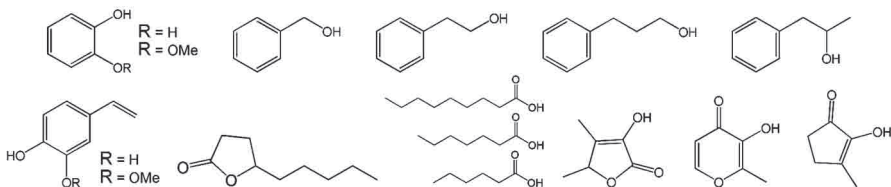


Figura 1.6 – Substâncias voláteis identificadas como responsáveis pelo aroma de suco de cana (garapa) e do melão.

Estudo da composição molecular da graxa epicuticular de cana é exemplo recente de como a análise multicomponente pode ser usada juntamente como métodos quimiométricos para revelar características fenológicas indicadoras de resistência do vegetal a situações específicas (Purcell et al., 2005). Foram utilizados como características químicas os catorze componentes principais da graxa epicuticular dos colmos, entre os quais sete aldeídos, cinco álcoois e dois alcanos, todos de cadeia carbônica longa (C24 a C33), cujos teores foram avaliados em 122 clones de cana-de-açúcar com diferentes níveis de resistência à broca da cana. As diferenças encontradas nos diversos clones analisados são fundamentalmente quantitativas, cada um possuindo uma proporção característica entre os vários componentes da graxa epicuticular.

Utilizando análise de componentes principais (PCA) foi possível classificar arbitrariamente as amostras em três grupos e relacioná-los com os constituintes da graxa. Através dessa análise foi possível relacionar os aldeídos triacontanal (C30), dotriacontanal (C32), tetratriacontanal (C34) e hexatriacontanal (C36) e o alcano heptacosano (C27) e o álcool triacontanol (C30) com os clones mais resistentes, enquanto os álcoois tetracosanol (C24), hexacosanol (C26) e octacosanol (C28) e o aldeído hexacosanal (C26) foram relacionados aos clones mais susceptíveis. Modelagem dessas informações através de quadrados mínimos parciais (PLS) confirmou a possibilidade de prever a susceptibilidade de clones a partir da composição química da graxa cuticular. Em outras palavras, esse método pode reduzir sensivelmente o tempo de desenvolvimento de novas variedades, uma vez que o melhorista poderá classificar novas plantas sem necessidade de experimentação biológica.

## Considerações finais

Os relatos apresentados acima indicam a necessidade de sistematização e complementação do conhecimento das alterações metabólicas associadas aos vários cultivares de cana-de-açúcar, visando o entendimento de suas funções nas variedades genéticas resistentes a doenças e a estresses ambientais. O estudo metabolômico detalhado de cana-de-açúcar durante os estágios de crescimento vegetal e sob condições diversas e severas de culti-

vo podem suportar essa proposta. Objetivos adicionais devem considerar a avaliação de alterações metabólicas durante a infecção/infestação da planta por patógenos e desenvolvimento de doenças, com intuito de identificar marcadores químicos de saúde vegetal e fatores de resistência a situações de estresse abiótico ou biótico.

## Referências bibliográficas

- ATKINSON, R.; AREY, J. Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: a review. *Atmospheric Environment*, v.37, sup.2, p.197-219, 2006.
- AVERY, J.; HAWORTH, W. N.; HIRST, E. L. The constitution of the disaccharides. Part XV. Sucrose. *Journal of the Chemical Society*, p.2308-2318, 1927.
- BALAKUMAR, T.; HANI, V.; VINCENT, B.; PALIWAL, K. On the interaction of UV-B radiation (280-315 nm) with water stress in crop plants. *Physiologia Plantarum*, v.87, p.217-22, 1993.
- BIELESKI, R. Sugar alcohols. In: LOEWUS, F. A.; TANNER, W. (Eds.). *Plant carbohydrates*. v.13A. New York: Springer-Verlag, 1982. p.158.
- BRINKER, A. M.; SEIGLER, D. S. Isolation and identification of piceatannol as a phytoalexin from sugar cane. *Phytochemistry*. v.30, p.3229-32, 1991.
- BRYCE, T. A.; MARTIN-SMITH, M.; OSSKE, G.; SCHREIBER K.; SUBRAMANIAN, G. Sterols and triterpenoids—XI. Isolation of arundoin and sawamilletin from Cuban sugar cane wax. *Tetrahedron*, v.23, p.1283-96, 1967.
- BURR, G. O.; HARTT, C. E.; BRODIE, W. H.; TANIMOTO, T.; KORTSCHAK, H. P.; TAKAHASHI, D.; ASHTON, F. M.; COLEMAN, R. E. The sugarcane plant. *Annual Review of Plant Physiology*, v.8, p.275-308, 1957.
- CASU, R. E.; DIMMOCK, C. M.; CHAPMAN, S. C.; GROF, C. P. L.; McINTYRE, C. L.; BONNETT, G. D.; MANNERS, J. M. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by *in silico* analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. *Plant Molecular Biology*, v.54, p.503-17, 2004.
- CHALKER-SCOTT, L.; FUCHIGAMI, L. H. The role of phenolic compounds in plant stress responses. In: LI, P.H. (Ed.). *Low temperature stress physiology in crops*. Florida: CRC Press, 1986. p.67-79.
- CLOSE, D. C.; McARTHOR, C. Rethinking the role of many plant phenolics: Protection from photodamage not herbivores? *OIKOS*, v.99, p.166-72, 2002.
- COLMER, T. D.; CORRADINI, F.; CAWTHRAY, G. R.; MARINUS, O. L. Analysis of dimethylsulphoniopropionate (DMS), betaines and other organic solutes in plant tissue extracts using HPLC. *Phytochemical Analysis*, v.11, p.163-8, 2000.
- COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETT-MANN, K. On-line identification of sugarcane (*Sacharum officinarum* L.) me-

- thoxyflavones by liquid-chromatography-UV detection postcolumn derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1082, p.51-9, 2005.
- COLOMBO, R.; YARIWAKE, H. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of further flavone C- and O-glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLC-UV-MS. *Phytochemical Analysis*, v.17, p.337-43, 2006.
- COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; McCULLAGH, M. Study of C- and O-glycosylflavones in sugarcane extracts using liquid chromatography-exact mass measurement mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.19, p.483-90, 2008.
- COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E.F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line Identification of Minor Flavones from Sugarcane Juice by LC/UV/MS and Post-Column Derivatization. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.20, p.1574-79, 2009.
- DE PASCALE, S.; MAGGIO, A.; FOGLIANO, V.; AMBROSINO, P.; RITIENI, A. Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidant activity of tomato. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v.76, p.447-53, 2001.
- DESHMANE, S. S.; DEV, S. Higher isoprenoids-II: Triterpenoids and steroids of *Saccharum officinarum* L. *Tetrahedron*, v.27, p.1109-18, 1971.
- DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, v.7, p.1085-97, 1995.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. *Phytochemistry*, v.68, p.1165-71, 2007.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; VIDAL NOVOA, A.; LINARES, A. F.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Antioxidant activity of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) juice. *Plant Foods for Human Nutrition*, v.61, p.187-192, 2006.
- FARMER, E. E. Surface-to-air signals. *Nature*, v.411, p.854-6, 2001.
- FONTANIELLA, B.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E.; DE ARMAS, R.; RODRÍGUEZ, C. W.; MARTÍNEZ, M.; PIÑÓN, D.; ACEVEDO, R.; SOLAS, M. T. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.41, p.1027-36, 2003.
- FOOT, J. P.; CAPORN, S. J. M.; LEE, J. A.; ASHENDEN, T. W. The effect of long-term ozone fumigation on the growth, physiology and frost sensitivity of *Calluna vulgaris*. *New Phytologist*, v.133, p.503-11, 1996.
- FRANÇA, S. C.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M. A.; PUGA, R. D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J. O. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology*, v.24, p.243-50, 2001.
- GEORGES, P.; SYLVESTRE, M.; RUEGGER, H.; BOURGEOIS, P. Ketosteroids and hydroxyketosteroids, minor metabolites of sugarcane wax. *Steroids*, v.71, p.647-52, 2006.



- GLASSOP, D.; ROESSNER, U.; BACIC, A.; BONNETT, G. D. Changes in the sugarcane metabolome with stem development. Are they related to sucrose accumulation? *Plant and Cell Physiology*, v.48, p.573-84, 2007.
- GLASSOP, D.; RYAN, L. P.; BONNETT, G. D.; RAE, A. L. The complement of soluble sugars in the *Saccharum* complex. *Biological Sciences*, v.3, p.110-22, 2010.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v.55, p.481-504, 2000.
- HARTT, C. E. Some effects of potassium upon the growth of sugar cana and upon the absorption and migration of ash constituents. *Plant Physiology*, v.9, p.399-490, 1934.
- HAVAUX, M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trend in Plant Science*, v.3, p.147-51, 1998.
- HOARAU, J. Y.; OFFMANN, B.; D'HONT, A.; RISTERUCCI, A. M.; ROQUES, D.; GLASZMANN, J. C.; GRIVET, L. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, v.103, p.84-97, 2001.
- JACKSON, S.; CHEN, Z. J. Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Current Opinions in Plant Biology*, v.13, p.153-9, 2010.
- KROL, M.; GRAY, G. R.; HURRY, V. M.; O'QUIST, G.; MALEK, L.; HUNER, N. P. A. Low-temperature stress and photoperiod affect an increased tolerance to photoinhibition in *Pinus banksiana* seedlings. *Canadian Journal of Botany*, v.73, p.1119-27, 1995.
- KUMAR, N.; NARAYANASWAMY, R. Studies of amino acids in red rot disease infected sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by HPLC. *Asian Journal of Chemistry*, v.18, p.1512-4, 2006.
- LEAL, E. R.; RODRÍGUEZ-VÁSQUEZ, R.; GALINDO, T. Separation of phenolic compounds from sugarcane bagasse pith and their determination by HPLC. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, v.14, p.369-82, 1994.
- LI, X.; YAO, S.; TU, B.; LI, X.; JIA, Ch.; SONG, H. Determination and comparison of flavonoids and anthocyanins in Chinese sugarcane tips, stems, roots and leaves. *Journal of Separation Science*, v.33, p.1216-23, 2010.
- LORETI, E.; ALPI, A.; PERATA, P. Glucose and disaccharide – sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos. *Plant Physiology*, v.123, p.939-48, 2000.
- MANNERS, J. M.; CASU, R. E. Transcriptome analysis and functional genomics of sugarcane. *Tropical Plant Biology*, v.4, p.9-21, 2011.
- MATERN, U.; GRIMMIG, B.; KNEUSEL, R. E. Plant cell wall reinforcement in the disease resistance response – Molecular composition and regulation. *Canadian Journal of Botany*, v.73, Sup. 1A-D, p.511-7, 1995.
- MENDEZ, M.; JONES, D. G.; MANETAS, Y. Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. *New Phytologist*, v.144, p.275-82, 1999.

- MUKHERJEE, S. K. Origin and distribution of *Saccharum*. *Botanical Gazette*, v.119, p.55-61, 1957.
- MÜLLER, J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Science*, v.112, p.1-9, 1995.
- NAKASONE, Y.; TANAKARA, K.; WADA, K.; TANAKA, J.; YOGI, S. Antioxidative compounds isolated from *Kokuto*, non-centrifuged cane sugar, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.60, p.1714-6, 1996.
- PECHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, v.5, p.237-43, 2002.
- PENUELA, J.; LLUSIA, J. BVOCs: plant defense against climate warming? *Trends Plant Science*, v.8, p.105-9, 2003.
- PEREIRA, J. R.; FERREIRA, G. B.; GONDIM, T. M. S.; SANTOS, J. W.; VALE, D. G. Adubação orgânica com torta de filtro de cana-de-açúcar no algodoeiro semiperene BRS. 200 no Cariri Cearense. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO 5. *Anais...* Salvador (BA), 2005.
- POMMERENIG, B.; PAPINI-TERZI, F. S.; SAUER, N. Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant Physiology*, v.144, p.1029-38, 2007.
- POWELL, R. G.; TEPASKE, M. R.; PLATTNER, R. D.; WHITE, J. F.; CLEMENT, S. L. Isolation of resveratrol from *Festuca versuta* and evidence for the widespread occurrence of this stilbene in the Poaceae. *Phytochemistry*, v.35, p.335-8, 1994.
- PURCELL, D. E.; LEONARD, G. J.; O'SHEA, M. G.; KOKOT, S. A chemometrics investigation of sugarcane plant properties based on the molecular composition of epicuticular wax. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v.76, p.135-147, 2005.
- PUSHPA, S.; SHRIVASTAVA, A. K.; SUMAN, A.; ARYA, N.; TIWARI, P.; RAI, R. K.; SINGH, J.; SINGH, A. K. Allelopathic effects of hidroxamic acids from sugarcane leaves on germination and growth of crops. *Allelopathy Journal*, v.23, p.203-12, 2009.
- RAJENDRAN, L.; RAVISHANKAR, G. A.; VENKATARAMAN, L. V.; PRATHIBA, K. R. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influence by nutrient stress and osmoticum. *Biotechnology Letters*, v.14, p.707, 1992.
- RODRÍGUEZ, C. W.; DE ARMAS, R.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. R. Changes in free and conjugated polyamines during starvation of sugarcane juices as analyzed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v.881, p.531-41, 2000.
- ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signalling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, v.57, p.675-709, 2006.
- ROPENACK, E.; PARR, A.; SCHULZE-LEFERT, P. Structural analysis and dynamics of soluble cell wall bound barley phenolics and their role in a broad-spectrum resistance to the powdery mildew fungus. *Journal of Biological Chemistry*, v.273, p.9013-22, 1998.

- SAKUMA, I.; MOMOSE, I. The coloring substances of cane sugar. *Journal of Society of Chemical Industry, Japan*, v.38, p.224-93, 1935.
- SAMPIETRO, D. A.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I. Plant growth inhibitors isolated from sugarcane (*Saccharum officinarum*) straw. *Journal of Plant Physiology*, v.163, p.837-46, 2006.
- SGHERRI, C.; STEVANOVIC, B.; NAVARI-IZZO, F. Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum*, v.122, p.478-88, 2004.
- SINGH, P.; SUMAN, A.; SHRIVASTAVA, K. Isolation and identification of allelochemicals from sugarcane leaves. *Allelopathy Journal*, v.12, p.71-80, 2003.
- STEVENS, R. Phenolic constituents of sugar cane. *International Sugar Journal*, v.61, p.199, 1959.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology*. 3.ed. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 2002.
- TAKARA, K.; MATSUI, D.; WADA, K.; ICHIBA, T.; CHINEN, I.; NAKASONE, Y. New phenolic compounds from Kokuto, non-centrifuged cane sugar. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.67, p.376-9, 2003.
- TAKARA, K.; MATSUI, D.; WADA, K.; ICHIBA, T.; NAKASONE, Y. New antioxidative phenolic glucosides isolated from *Kokuto* non-centrifuged cane sugar. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, v.66, p.29-35, 2002.
- TOKIMOTO, Y.; KOBAYASHI, A.; YAMANISHI, T. Aroma components of fresh sugar cane juice. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.48, p.2869-70, 1984.
- VILA, F. C.; COLOMBO, R.; LIRA, T.; YARIWAKE, J. H. HPLC microfractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, v.19, p.903-8, 2008.
- VILLAS-BÔAS, S. G.; RASMUSSEN, S.; LANE, G. Metabolomics or metabolite profiles? *Trends in Biotechnology*, v.23, p.385-6, 2005.
- WAHID, A.; GHAZANFAR, A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *Journal of Plant Physiology*, v.163, p.723-30, 2006.
- WAHID, A. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. *Journal of Plant Research*, v.120, p.219-28, 2007.
- WIGGINS, L. F.; WILLIAMS, J. H. Amino acid content of West Indies sugar cane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.3, p.341-45, 1955.
- WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B.; SMITH, P. The taxonomic significance of leaf flavonoids in *Saccharum* and related genera. *Phytochemistry*, v.13, p.1141-9, 1974.
- WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, v.5, p.218-23, 2002.
- ZHANG, S. Z.; YANG, B. P.; FENG, C. L. Expression of the *Grifola frondosa* trehalose synthase gene and improvement of drought tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Journal of the Integrative Plant Biology*, v.48, p.453-9, 2006.

## 2

# Estudos da dormência e do condicionamento fisiológico de sementes: possíveis contribuições à propagação de espécies vegetais com potencial energético

*Edvaldo Aparecido Amaral da Silva,  
Cláudio Cavariani, Simoni Anese, Sue Ellen Ester Queiroz,  
Ana Carla Resende Fraiz*

### Introdução

O Brasil, país com expressiva biodiversidade, é também o local de origem de várias espécies vegetais de importância econômica mundial, destacando-se a castanha do Pará, a seringueira, o mogno, a mandioca e outras. Além dessas espécies, já mundialmente conhecidas e utilizadas, as espécies com potencial energético podem diversificar a matriz energética brasileira e, desse modo, reduzir a dependência de fontes não renováveis de energia.

Atualmente no Brasil, iniciativas governamentais têm criado incentivos à produção de matérias-primas para suprir a demanda por biodiesel. Todavia, várias dessas espécies carecem de estudos que possam favorecer a propagação com o desenvolvimento de métodos e protocolos de propagação mais eficiente.

Nesse sentido, estudos sobre os mecanismos de dormência e germinação, apoiados em técnicas de pré-semeadura, como o condicionamento fisiológico, ampliarão as perspectivas quanto a utilização das espécies de potencial energético por contribuir na sua propagação.

Existe, na literatura brasileira, elevado número de trabalhos científicos que contemplam métodos para a superação da dormência de sementes de várias espécies vegetais. Entretanto, poucos deles visaram ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos da germinação e da dormência em

associação com as condições ambientais. Tais conhecimentos, quando gerados, podem, por exemplo, possibilitar o entendimento da influência do ambiente (temperatura, luz e precipitação) na superação da dormência e na germinação das sementes.

Adicionalmente, o uso da técnica de condicionamento fisiológico (*priming*) constitui uma ferramenta importante não apenas por proporcionar germinação mais rápida e uniforme, mas, também, por induzir tolerância às sementes durante a geminação e o desenvolvimento de plântulas e plantas em condições adversas de ambiente.

Assim, estudos fisiológicos e tratamentos de pré-semeadura, juntamente com os avanços alcançados na área da genômica, transcriptoma, proteoma e metaboloma, podem proporcionar a identificação de genes, proteínas e metabólitos envolvidos com os referidos processos biológicos e, também, com a qualidade das sementes. O conjunto dessas iniciativas deve resultar no desenvolvimento de marcadores moleculares para auxiliar no monitoramento da qualidade das sementes, para predizer seu desempenho, além de ter sua aplicação no melhoramento vegetal pela seleção assistida por marcadores. Finalmente, transformações genéticas, objetivando a melhoria da qualidade de sementes, podem também ser aplicadas.

Atualmente, existe um grande número de espécies vegetais cujos genomas ou ESTs (*Expressed sequence tags*) foram realizados e, para muitas delas, as informações encontram-se disponíveis para acesso. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Entre as espécies com potencial para utilização na produção de biodiesel, cita-se a *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão). Nessa espécie 13.249 ESTs foram obtidas durante o desenvolvimento e a germinação das sementes (Costa et al., 2010).

## Definição de dormência

De acordo com Bewley (1997), a dormência pode ser interpretada como uma falha de uma semente intacta e viável em germinar sob condições aparentemente favoráveis à germinação. Para Laboriau (1983), a dormência de sementes é definida como uma condição negativa, ou seja, mesmo sob condições ambientais favoráveis ou normalmente adequadas, a germinação não ocorre.

Em um conceito mais amplo, a dormência de sementes pode ser entendida como um fenômeno que determina a ausência momentânea ou a lenta germinação de sementes viáveis, apesar da existência de condições ambientais favoráveis ao processo.

## **Tipos de dormência**

A classificação de dormência segundo a sua origem contempla dois tipos de dormência: a primária ou inata, e a secundária, ou induzida.

### **Dormência primária**

A dormência primária instala-se durante a fase de desenvolvimento e/ou maturação, de modo que a semente é dispersa já em estado dormente, exigindo tratamentos ou condições específicas para tornar-se quiescente. As sementes, durante seu desenvolvimento, podem adquirir capacidade de germinar logo após a maturação, mas existem, na maioria das espécies, mecanismos controladores do crescimento do embrião que impedem a germinação na planta mãe. A persistência dos fatores restritivos à germinação, após a maturidade e dispersão da semente, caracteriza a dormência primária.

O ácido abscísico (ABA), entre outros fatores, é responsável pela indução da dormência. A dormência primária não depende só do genótipo, mas também das condições ambientais durante a maturação. Fatores como a posição da flor ou inflorescência na planta, posição da semente na inflorescência ou no fruto e idade da planta mãe durante a indução floral ou maturação da semente também influenciam, diretamente, o grau de dormência de uma semente, alterando sua capacidade de germinação.

A dormência primária possui duas funções básicas: a primeira é impedir a germinação precoce das sementes durante a fase de maturação; a segunda função é distribuir a germinação das sementes no tempo, ou seja, evitar que todas tenham germinação sincronizada. A estratégia amplia as possibilidades de sobrevivência da espécie, mas interfere negativamente na sua propagação comercial.

## **Dormência secundária**

A dormência secundária de sementes ainda não foi completa e suficientemente elucidada na literatura pertinente. É reconhecido que as sementes com dormência secundária são as que germinam normalmente, mas quando expostas a fatores ambientais desfavoráveis, são induzidas ao estado de dormência. Portanto, a dormência secundária pode ocorrer em sementes anteriormente não dormentes ou com dormência primária superada. De acordo com Hilhorst (1995), as sementes podem passar por “ciclos de dormência”, pela ocorrência sucessiva de indução e superação da dormência secundária após o declínio da dormência primária (não dormente), dependente das variações de fatores ambientais, até que as condições se tornem favoráveis à germinação.

## **Causas da dormência**

Bewley e Black (1982) reconheceram basicamente as seguintes causas de dormência: dormência do embrião, incluídos os casos de inibição metabólica e imaturidade do embrião, e dormência imposta pelo envoltório (ou tecido de cobertura), relacionada aos casos de impermeabilidade do tegumento, presença de inibidores e restrição mecânica. Um sistema mais abrangente dividiu a dormência do embrião (dormência endógena) em fisiológica, morfológica e morfofisiológica, e a dormência imposta pelo envoltório (ou exógena) em física, química e mecânica (Baskin e Baskin, 1998).

Considerando uma abordagem mais clássica, as causas de dormência em sementes são: impermeabilidade do tegumento à água; impermeabilidade da cobertura protetora a trocas gasosas; resistência mecânica imposta pelo tegumento, pericarpo ou tecidos de reserva; ação de substâncias inibidoras da germinação e imaturidade do embrião.

## **Impermeabilidade do tegumento à água**

As sementes com tegumento impermeável à água são conhecidas por sementes duras, dureza que confere atraso na germinação das sementes. Esse mecanismo de dormência é induzido durante o processo de maturação, no período de acúmulo de matéria seca. No tegumento, ou envoltório, dessas sementes são depositadas substâncias de natureza orgânica e hidrofóbica (lipídios, suberinas, cutinas e ligninas) em uma ou mais camadas de célula

que impedem a entrada de água na semente. A hidratação e a conseqüente superação da dormência estão relacionadas, em muitos casos, à formação de aberturas em estruturas anatômicas especializadas, como o hilo, por exemplo, localizado na superfície da semente, em que ocorre a redução da resistência à entrada de água (Baskin e Baskin, 2004).

A impermeabilidade do tegumento à água é considerada uma das causas mais comuns de dormência em sementes de espécies tropicais e verificadas com frequência nas seguintes famílias: Fabaceae (leguminosas, principal grupo), Cannaceae, Chenopodiaceae, Convallariaceae, Convolvulaceae, Gramineaceae, Malvaceae, Solanaceae, Anacardiaceae e Rhamnaceae. Além dessas, diversas espécies de palmeiras possuem dormência, principalmente relacionada à impermeabilidade à penetração de água para o embrião e o endosperma.

As sementes podem ser dispersas com diferentes graus de impermeabilidade à água ou dureza, por influência do genótipo, da desuniformidade de maturação e das alterações das condições climáticas durante a fase de maturação. Devido a essas diferenças de profundidade de dormência das sementes, esse mecanismo possui importante papel ecológico de distribuição na germinação no tempo. A superação da dormência devido a impermeabilidade à entrada de água ocorre na natureza, por processos que envolvem a participação e a interação de microrganismos e temperaturas alternadas, e, também, devido a ingestão das sementes por animais.

### **Impermeabilidade do tecido de cobertura a trocas gasosas**

Neste caso de dormência, os tecidos impermeáveis que circundam o embrião limitam sua capacidade de trocas gasosas de modo a impedir o acesso necessário ao oxigênio obrigatório à germinação, mantendo a semente dormente. É sugerido por alguns autores que o tegumento ou envoltório das sementes possam oferecer resistência à entrada de oxigênio ou à saída de gás carbônico durante a embebição. Entre outros fatores, a composição química e a estrutura do tegumento podem controlar as trocas gasosas da semente e o meio.

### **Resistência mecânica**

A ocorrência de sementes com dormência mecânica é causada por tecidos que impedem à expansão do embrião e protrusão da radícula. Nesse



caso, a absorção de água e oxigênio ocorrem normalmente pelas sementes, sendo que, o crescimento do embrião é limitado pela rigidez dos tecidos que o envolvem. Essa dormência, muitas vezes, é relacionada ao endosperma que é muito rígido, como o endosperma micropilar (endosperma localizado na frente da radícula).

Endosperma micropilar rígido, que precisa ser enfraquecido para ocorrer a protrusão da radícula, já foi constatado em diversas espécies, tais como tomate (*Solanum esculentum*) (Groot; Karszen, 1987; Toorop; Bewley; van Aelst; Hillhorst, 1996; Toorop; van Aelst; Hillhorst, 2000), pimenta (*Capsicum annum*) (Watkins; Cantliffe, 1983), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Leubner-Metzger et al., 1995); melão (*Cucumis melo*) (Welbaum et al., 1995), *Datura ferox* (Sanchez et al., 1986); café (*Coffea arabica*) (Silva et al., 2004); lobeira (*Solanum lycocarpum*) (Pinto et al., 2007); e jenipapo (*Genipa americana*) (Queiroz, 2009). A superação desse mecanismo de dormência ocorre devido a ação de várias enzimas, entre elas,  $\alpha$ -galactose (EC 3.2.1.22),  $\beta$ -manosidase (EC 3.2.1.25) e endo- $\beta$ -mananase (EC 3.2.1.78), no enfraquecimento do endosperma micropilar por hidrólise de mananas e galactomananas, presentes nas paredes celulares do endosperma micropilar das sementes.

### **Substâncias inibidoras**

A dormência causada por substâncias inibidoras está relacionada à substâncias produzidas tanto fora como dentro das sementes, que, quando translocadas para o embrião, podem inibir a germinação. Portanto, inibidores, presentes tanto na semente quanto no fruto, podem inibir a germinação em situações em que o embrião não se encontra dormente.

### **Imaturidade do embrião**

As sementes de algumas espécies vegetais podem ser dispersas com embrião fisiologicamente imaturo, que necessita ter o desenvolvimento completado para que a germinação ocorra. No primeiro caso, as sementes são dispersas da planta mãe com embrião não diferenciado, ou seja, não é possível identificar as partes principais do embrião, como os cotilédones, hipocótilo e radícula. Nesse caso, o embrião teria que finalizar o seu desenvolvimento após a dispersão. Algumas sementes de orquídeas são dispersas com o embrião formado por uma massa de células na qual não é possível

identificar as partes do embrião. Alguns autores classificam esse tipo de dormência como dormência morfológica.

Outras espécies vegetais têm suas sementes dispersas com embrião pouco desenvolvido, embora diferenciado em cotilédones e em eixo hipocótilo-radícula, mas com barreiras fisiológicas. Nesse caso, a germinação é precedida por uma fase de crescimento desencadeada por condições ambientais apropriadas. A combinação de dormência morfológica e fisiológica é chamada de dormência morfofisiológica. Sementes de *Annona crassiflora*, também conhecida como marolo ou araticum, é um exemplo de espécie que tem dormência morfofisiológica.

Do ponto de vista prático, a dormência presente em sementes de *Annona crassiflora* compromete a produção de mudas da espécie. Exemplo de que a pesquisa tem auxiliado nesse aspecto é com relação ao entendimento das condições ambientais necessárias para a superação da dormência dessa espécie. Hoje é conhecido que as oscilações de temperaturas, bem como temperatura baixa do solo, próximas a 10°C durante os meses de junho e julho, são necessárias para a superação da dormência.

## Condicionamento fisiológico de sementes

Condicionamento fisiológico, ou *priming*, de sementes é uma importante tecnologia pré-semeadura usada comercialmente para aprimorar a qualidade de sementes, traduzido por elevação da taxa de germinação, uniformidade de emergência de plântulas e, em alguns casos, liberação de dormência, em diferentes espécies. A técnica envolve a hidratação controlada das sementes – suficiente para promover atividades pré-metabólicas nas fases iniciais da germinação (fases I e II), sem, contudo, ocorrer a protrusão da radícula (fase III) – e secagem posterior para grau de umidade anterior à aplicação do tratamento (Heydecker; Higgins; Gulliver; 1973; Karssen *et al.*, 1989; McDonald, 1998; Powel *et al.*, 2000). Os benefícios do *priming* são constatados depois da reidratação. Em geral, ocorre após o tratamento a redução da fase II, porque parte da preparação para entrada na fase III não precisa ser repetida, de modo que a germinação subsequente é mais rápida e sincronizada (Powel *et al.*, 2000; Karssen *et al.*, 1989).

Soluções osmóticas, com agentes inorgânicos, como o NaCl, KNO<sub>3</sub> e MgSO<sub>4</sub>, e orgânicos, como polietilenoglicol (PEG), têm sido usadas e referem-se ao *osmopriming*. Já o *hidropriming* envolve o uso de água, com o controle da embebição realizado em função do período de tempo que as sementes se mantêm em contato com a água e pela temperatura. A eficiência do *osmopriming* sobre vigor, uniformidade de germinação, estabelecimento de diferentes espécies e tolerância a condições de estresse é relatada em muitos estudos (Ella; Dionisio-Sese; Ismail, 2011; Kissmann et al., 2010; Butler et al., 2009; Kausar et al., 2009; Nascimento, 2005; Liu et al., 1996).

Contudo, o *hidropriming* tem vantagens por ser mais simples, econômico e de fácil aplicação, porque somente água é utilizada durante a embebição (Farooq et al., 2006a). *Hidropriming* tem sido usado com sucesso em sementes de cereais (Farroq; Barsa; Wahid, 2006b; Moradi Dezfuli; Sharif-Zadeh; Janmohammadi, 2008), em hortaliças (Caseiro; Bennett; Marcos Filho, 2004; Venkatasubramanian; Umarani, 2007; Marcos Filho; Kikuti, 2008) e em sementes de espécies florestais (Pinedo; Ferraz, 2008; Anese et al., 2011).

Os benefícios proporcionados pelo *priming* são influenciados por muitos fatores. Inicialmente, para definir as melhores situações de condicionamento, é necessário conhecer o comportamento da embebição e da fase inicial da germinação da espécie de interesse. Após isso, é necessário determinar a melhor combinação de potencial osmótico, agente condicionador, período de tempo e temperatura em que as sementes ficarão expostas ao tratamento e o efeito da secagem após o tratamento (Badek; van Duijn; Grzesik, 2006). Portanto, não há um procedimento único para o condicionamento de sementes de diferentes espécies, o que torna necessário o desenvolvimento de pesquisas para estabelecer um protocolo eficiente para a espécie, ou mesmo cultivar.

Quando o condicionamento das sementes for favorável, diversos eventos metabólicos podem ser ativados e contribuem com a melhoria da germinação subsequente. Os benefícios têm sido associados à ativação de mecanismos de reparos macromoleculares e do sistema de membranas, incremento nas atividades enzimáticas e mobilização de açúcares e proteínas (Srinivasan; Saxena; Singh, 1999; McDonald, 1998). Em revisão recente, Varier e colaboradores (2010) resumiram os principais processos, em nível subcelular, resultantes da aplicação do *priming*. Foi destacado, mediante estudos

envolvendo análise proteômica, que enzimas associadas com a mobilização de reservas são ativadas ou sintetizadas durante o condicionamento. Além disso, foi possível detectar o acúmulo de proteínas com a função de minimizar danos celulares.

Da mesma forma, estudos de expressão gênica revelaram a presença de genes que codificam proteínas envolvidas na produção de energia e defesas químicas. O condicionamento também proporciona a pré-ativação do ciclo celular, pelo preparo das células do embrião para a divisão, por aumentar a síntese de  $\beta$ -tubulina, que é um componente dos microtúbulos, mostrando-se, assim, como um dos mecanismos que propicia desempenho superior da germinação de sementes submetidas ao tratamento.

O condicionamento fisiológico, para algumas espécies, também está envolvido no mecanismo de superação de dormência. O enfraquecimento do endosperma micropilar tem sido proposto como o evento que controla a germinação de diferentes espécies, tais como alface (*Lactuca sativa*) (Nascimento; Cantliffe; Huber, 2004), tomate (Groot et al., 1988) e *Solanum lycocarpum* (Pinto et al., 2007). Endo- $\beta$ -mananase (EBM) é uma enzima relacionada com o enfraquecimento do endosperma micropilar de tomate (Still; Bradford, 1997; Toorop, 1998). Foi demonstrado em sementes de tomate durante o *priming* aumento da atividade de EBM e redução da força de ruptura do endosperma micropilar (Still; Bradford, 1997; Toorop, 1998).

Do mesmo modo, em sementes de alface, EBM é uma enzima chave na regulação do enfraquecimento do endosperma e exige a ação do etileno para ser ativada. Altas temperaturas durante a embebição das sementes podem inibir a germinação através da supressão da síntese de etileno que, por sua vez, reduz a atividade de EBM (Nascimento; Cantliffe; Huber, 2004). O condicionamento das sementes em PEG (-1,2 MPa), à 15°C, mostrou-se eficiente para superar os efeitos inibitórios da alta temperatura em sementes de alface, melhorando a germinação e a atividade de EBM, o que sugere a capacidade do osmocondicionamento proporcionar a superação da termodormência, mesmo em condições de supressão da síntese de etileno (ibidem).

Para ocorrer a germinação de sementes dormentes de *S. lycocarpum*, uma espécie nativa do bioma Cerrado e importante colonizadora de áreas degradadas, é necessário o enfraquecimento do endosperma micropilar, processo coincidente com a elevação da atividade de EBM nessa região do endosperma (Pinto et al., 2007). Anese e colaboradores (2011) constataram

ambos os fenômenos durante o condicionamento em água (*hidropriming*) de sementes de *S. lycocarpum*, por quinze dias, à 15°C.

Assim, o enfraquecimento do endosperma micropilar, e consequente redução da força de resistência ao alongamento do embrião e da protrusão radicular na germinação subsequente das sementes, resultou em diminuição do tempo necessário para 50% de germinação (T50), elevação da uniformidade de germinação e melhor desempenho das mudas em condições de viveiro, traduzidos por incrementos em emergência, em altura, em diâmetro e em massa da matéria seca das plantas jovens. Foi sugerido a possibilidade do emprego da técnica de *priming* para beneficiar a produção de mudas na restauração de áreas degradadas *in situ*, por exemplo.

Em espécies agrícolas, como a soja, Bejandi e colaboradores (2009) verificaram efeito positivo da imersão das sementes em água durante doze horas, à 25°C, seguida de secagem, assim como da imersão com a adição de auxina e giberelina à taxa média de emergência, aos conteúdos relativos de água das folhas e de clorofila, ao comprimento da parte aérea e à produtividade de grãos em condições salínicas. Rouhi e colaboradores (2011) avaliaram o efeito do *osmopriming* e do *hidropriming* na melhoria qualitativa de lotes de sementes de soja. O *osmopriming* em PEG (-1,2 MPa), por doze horas, foi o tratamento que resultou em valores superiores de germinação, de velocidade de germinação e de comprimento das plântulas, com a conclusão de constituir excelente técnica para aprimorar o desempenho fisiológico das sementes, inclusive das de vigor inferior, traduzido por emergência uniforme de plântulas no campo.

O condicionamento fisiológico pode favorecer a germinação e o crescimento de plântulas sob condições de déficit hídrico em sementes de oleaginosas, como o girassol (Kaya et al., 2006). Em condições de campo, a imersão de sementes de girassol em água durante 24 horas a 27°C, seguida de secagem, promoveu aumento na velocidade de emergência das plântulas (Hussain et al., 2006). Barros e Rossetto (2009) demonstraram que o osmocondicionamento dos aquênios de girassol em KNO<sub>3</sub> foi eficiente em promover a superação da dormência e/ou o reparo metabólico do lote de aquênios envelhecido artificialmente. Em sementes de canola, outra cultura com potencial para produção de biodiesel, Basra e colaboradores (2003) relataram que o *priming* afetou significativamente os parâmetros de crescimento e registrou um aumento no índice de área foliar e acúmulo de matéria seca.

Sementes de linhagens híbridas de milho submetidas ao *hidropriming* por 36 horas, tiveram elevada germinação e maior comprimento radicular das plântulas em comparação ao controle (Moradi Dezfuli; Sharif-Zadeh; Janmohammadi, 2008). Do mesmo modo, o condicionamento osmótico realizado por três dias com polietilenoglicol, sob potenciais de -1,0 MPa e -1,2 MPa, proporcionou aumento da germinação de sementes de milho doce armazenadas por seis meses, e pode constituir uma alternativa para superar a queda de germinação durante o armazenamento (Oliveira et al., 2007).

Apesar dos estudos realizados e tendo em vista a diversidade de espécies da flora brasileira com potencial energético, são necessárias, ainda, mais informações a respeito do condicionamento fisiológico das sementes para esse grupo vegetal. Assim, investigações mais detalhadas para desvendar as bases fisiológicas, bioquímicas e os aspectos da biologia molecular das sementes, durante e após a aplicação do condicionamento fisiológico (*osmopriming* e ou *hidropriming*), poderiam indicar os aprimoramentos necessários da técnica e, conseqüentemente, o desenvolvimento dos protocolos adequados para o alcance de benefícios reais que contribuam à expansão da produção.

### **Mecanismos fisiológicos e moleculares associados às sementes submetidas ao condicionamento fisiológico**

Embora os efeitos da técnica de *priming* sejam conhecidos, conferindo tolerância às situações de estresse, ainda não existem trabalhos suficientes para desvendar os mecanismos moleculares associados a essa tolerância. Assim, atualmente, uma linha de pesquisa que se destaca são os estudos voltados para promover não apenas rápida e uniforme germinação às sementes, mas, também, para conhecer em nível molecular quais proteínas são induzidas durante os tratamentos que favorecem a emergência das plântulas e o desenvolvimento das plantas em situações de estresse.

Os estresses ambientais podem provocar perdas na planta, porém, em contrapartida, acarretar respostas de prevenção e de reparo (Kranter et al., 2010) que são controladas em nível molecular mediante mudanças na expressão gênica. As plantas são capazes de expressar um tipo de “memória”, também chamada de “impressão do estresse”. Essa impressão, comumente traduzida por modificações genéticas e bioquímicas induzidas por uma primeira exposição ao estresse, aumenta a resistência a uma condição ad-

versa subsequente (Bruce et al., 2007), mediante a indução de respostas de tolerância. A tolerância pode estar relacionada a um arranjo de respostas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares que diminuem as perdas causadas pela exposição ao estresse, ou facilitam o reparo de perdas do sistema (Potters et al., 2007).

Alguns trabalhos indicam que o efeito benéfico do condicionamento fisiológico diante do estresse tem sido associado ao acúmulo de mRNA e de proteínas inativas produzidas durante o condicionamento osmótico (Bray et al., 1989; Gallardo et al., 2001; Ozbingol et al., 1999), ao reparo e síntese de novas moléculas de DNA e RNA (Kausar et al., 2009) e ao aumento da síntese de antioxidantes (Chen; Arora, 2011; Srivastava et al., 2010). Esses são alguns exemplos de eventos que contribuem para a preservação da integridade do genoma e para a qualidade de sementes. Soeda e colaboradores (2005) identificaram expressão de genes relacionados à tolerância a estresse durante o condicionamento de sementes de *Brassica oleracea*, como SOD (superóxido dismutase), HSP (proteínas de choque térmico) e LEA (proteínas abundantes do final da embriogênese).

Além de mudanças na síntese de macromoléculas, outro modo das plantas superarem condições adversas é evitar o estresse. Esse mecanismo é conhecido como escape (Larcher, 2000) e também pode ser desencadeado pelo condicionamento osmótico. Índices superiores de velocidade de germinação (IVG) de sementes condicionadas, em relação as não condicionadas, foram observados em trabalhos de pesquisa e significam redução do tempo entre a semeadura e a protrusão da radícula, ou seja, maiores chances de escape a possíveis intempéries ambientais.

A maior eficiência na absorção de água do meio, o início antecipado das atividades metabólicas do processo de germinação (Hassanpouraghdam, et al., 2009) e a menor aderência do tegumento durante a emergência das plântulas (Nascimento; West, 1998) são justificativas ao menor tempo para a protrusão da radícula, como demonstrados em *Cucumis melo* e *Brassica napus*. O reduzido espaço de tempo para a protrusão da radícula e emergência das plântulas, a partir da semeadura, é considerado a característica que proporciona possível vantagem ecológica no estabelecimento da planta em áreas com condições subótimas (Bewley; Black, 1994), como baixas e altas temperaturas (Wahid; Shabbir, 2005), baixas umidades no solo (Du; Tuong, 2002) e salinidade (Wahid et al., 2007).

Outras características encontradas foram maior capacidade de ajustamento osmótico das células e a maior quantidade de açúcar e ácidos orgânicos em plantas de tomate originárias de sementes condicionadas em soluções salinas. Nesse caso, as plantas de tomate mostraram maior tolerância à salinidade do solo (Cayuela et al., 1996).

## Referências bibliográficas

- ANESE, S.; DASILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C.; ROCHA FARIA, J. M.; SOARES, G. C. M.; MATOS, A. C. B.; TOOROP, P. E. Seed priming improves endosperm weakening, germination, and subsequent seedling development of *Solanum lycopersicum* St. Hil. *Seed Science and Technology*, v.39, p.125-39, 2011.
- BADEK, B.; VAN DUIJN, B.; GRZESIK, M. Effects of water supply methods and seed moisture content on germination of China aster (*Callistephus chinensis*) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. *European Journal of Agronomy*, v.24, p.45-51, 2006.
- BALESTRAZZI, A.; CONFALONIERI, M.; MACOVEI, A.; CARBONERA, D. Seed imbibition in *Medicago truncatula* Gaertn.: Expression profiles of DNA repair genes in relation to PEG-mediated stress. *Journal Plant Physiology*, n.168, v.7, p.706-13, 2010.
- BARROS, C. S.; ROSSETTO, C. A. V. Condicionamento fisiológico de aquênios de girassol. *Ciência Rural*, v.39, p.1667-75, set. 2009.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. New York: Academic Press, p.5-26, 1998.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, v. 14, p. 1-16, 2004.
- BASRA, M. A. S.; EHSANULLAH, E. A.; WARRAICH, M. A.; AFZAL, I. Effect of storage on growth and yield of primed canola (*Brassica napus*) seeds. *International Journal of Agriculture & Biology*, v.5, p.117-20, 2003.
- BEJANDI, T. K.; SEDGHI, M.; SHARIFI, R. S.; NAMVAR, A.; MOLAEI, P. Seed priming and sulfur effects on soybean cell membrane stability and yield in saline soil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, p.1114-7, set. 2009.
- BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, v.9, n.3, p.1055-66, 1997.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. *Physiology and biochemistry of seed in relation to germination: viability, dormancy and environmental control*. Berlin: Springer-Verlag, 1982.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. *Seeds: physiology of development and germination*. New York: Plenum Press, 1994. 455p.
- BRAY, C. M.; DAVISON, P. A.; ASHRAF, M.; TAYLOR, R.M. Biochemical changes during priming of leek seeds. *Annals of Botany*, v.63, p.185-93, 1989.



- BRUCE, T. J. A.; MATTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; PICKETT, J. A. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Science*, v.173, p.603-8, 2007.
- BUTLER, L. H.; HAY, F. R.; ELLIS, R. H.; SMITH, R. D.; MURRAY, T. B. Priming and re-drying improve the survival of mature seeds of *Digitalis purpurea* during storage. *Annals of Botany*, v.103, p.1261-70, 2009.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4.ed. Jaboticabal: Funep, 2000.
- CASEIRO, R.; BENNETT, M. A.; MARCOS FILHO, J. Comparison of three techniques for onion seed lots differing in initial quality. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.32, p.365-75, 2004.
- CAYUELA, E.; PEREZ-ALFOCEA, F.; CARO, M.; BOLARIN, M. C. Priming of seeds with NaCl induces physiological changes in tomato plants grown under salt stress. *Physiologia Plantarum*, v.96, p.231-6, 1996.
- CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). *Plant Science*, v. 180, p.212-20, 2011.
- COSTA, G. G.; CARDOSO, K. C.; DEL BEM, L. E.; LIMA, A. C.; CUNHA, M. A.; DE CAMPOS-LEITE, L.; VICENTINI, R.; PAPES, F.; MOREIRA, R. C.; YUNES, J. A.; CAMPOS, F. A.; DA SILVA, M. J. Transcriptome analysis of the oil-rich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L. *BMC Genomics*, v.11, p.2-9, 2010.
- DU, L. V.; TUONG, T. P. Enhancing the performance of dry-seeded rice: effects of seed priming, seedling rate, and time of seedling. In: PANDEY S.; MORTIMER, M.; WADE, L.; TUONG, T. P.; LOPES K.; HARDY, B. (Eds.). *Direct seeding: research strategies and opportunities*. Manila, Philippines: International Research Institute, 2002. p.241-56.
- ELLA, E. S.; DIONISIO-SESE, M. L.; ISMAIL, A. M. Seed pre-treatment in rice reduces damage, enhances carbohydrate mobilization and improves emergence and seedling establishment under flooded conditions. *AoB Plants*, v. 7, p.1-11, 2011.
- FAROOQ, M.; BASRA, M. A. S; AFZAL, I.; KHALIQ, A. Optimization of hydropriming techniques for rice seed invigoration. *Seed Science and Technology*, v.34, p.507-12, 2006a.
- FAROOQ, M.; BARSA, S. M. A.; WAHID, A. Priming of field-sown rice seed enhances germination, seedling establishment, allometry and yield. *Plant Growth Regulation*, v.49, p.285-94, 2006b.
- FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- GALLARDO, K.; JOB, C.; GROOT, S. P. C.; PUYPE, M.; DEMOL, H.; VANDEKERCKHOVE, J.; JOB D. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiology*, v.126, p.835-48, 2001.
- GROOT, S. P. C.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm cap weakening: a study with gibberellin-deficient mutant. *Planta*, v.171, p.525-31, 1987.

- GROOT, S. P. C.; KIELISZEWSKA-ROKICKA, B.; VERMEER, E.; KARSEN, C. M. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta*, v.174, p.500-4, 1988.
- HASSANPOURAGHDAM, M. B; PARDAZ J. E.; AKHTAR N. F. The effect of osmo-priming on germination and seedling growth of *Brassica napus* L. under salinity conditions. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v.7, n.2, p.620-2, 2009.
- HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. *Nature*, v.246, p.42-4, 1973.
- HILHORST, H. W. M. A critical update on seed dormancy. *Seed Science Research*, Wallingford, v. 5, n. 1, p.51-73, 1995.
- HILHORST, H. W. M; GROOT, S. C. P.; BINO, R. J. The tomato seed as a model to study seed development and germination. *Acta Botanica Neerlandica*, v.47, n.2, p.169-83, 1998.
- HUSSAIN, M.; FAROOQ, M.; BASRA, S. M. A.; AHMAD. N. Influence of Seed Priming Techniques on the Seedling Establishment, Yield and Quality of Hybrid Sunflower. *International Journal of Agriculture & Biology*, v.8, p.14-8, 2006.
- KARSEN, C. M.; HAIGH, A.; VAN DER TOORN, P.; WEGES, R. Physiological mechanisms involved in seed priming. In: TAYLORSON, R. B. (Ed). *Recent advances in the development and germination of seeds*. New York: Plenum, 1989. p.269-80.
- KAUSAR, M.; MAHMOOD, T.; BASRA, S.M.A.; ARSHAD, M. Invigoration of Low Vigor Sunflower Hybrids by Seed priming. *International Journal Of Agriculture & Biology*, v.11, n.5, p.521-8, 2009.
- KAYA, M. D.; GAMZE, O.; ATAL, M.; YAKUP, C.; OZER, K. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal Agronomy*, v.24, p.291-5, 2006.
- KISSMANN, C.; SCALON, S. P. Q.; MOTA, L. H. S.; VIEIRA, M. C. Germinação de sementes de *Stryphnodendron* Mart. Osmocondicionadas. *Revista Brasileira de Sementes*, v.32, p.26-35, 2010.
- KRANNER, I.; MINIBAYEVA, F. V.; BECKETT, R. P.; SEA, C. E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist*, v.188, p.655-73, 2010.
- LABORIAU, L. G. *A germinação das sementes*. Washington: Secretaria Geral da OEA, 1983.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: Rima-Artes e Textos, 2000.
- LEUBNER-METZGER, G.; FRÜNDT, C.; VÖGELI-LANGE, R. MEINS-JR, F. Class I  $\beta$ -1,3-glucanase in endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiology*, v.109, p.751-9, 1995.
- LIU, Y.; BINO, R. J.; VAN DER BURG, W. J.; GROOT, S. P. C.; HILHORST, H. W. M. Effects of osmotic priming on dormancy and storability of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. *Seed Science Research*, v.6, p.49-55, jun. 1996.

- MARCOS FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: Fealq, 2005.
- MARCOS FILHO, J.; KIKUTI, A. L. Condicionamento fisiológico de sementes de couve-flor e desempenho das plantas no campo. *Horticultura Brasileira*, v.26, p.165-9, 2008.
- McDONALD, M. B. Seed quality assessment. *Seed Science Research*, v.8, p.265-75, jun. 1998.
- MIGUEL, L.; SÁNCHEZ, R. A. Phytochrome induced germination, endosperm softening and embryo growth potential in *Datura ferox* seeds: sensitivity to low water potential and time of scape to FR revesal. *Journal of Experimental Botany*, v.43, p.969-74, 1992.
- MORADI DEZFULI, P.; SHARIF-ZADEH, F.; JANMOHAMMADI, M. Influence of priming techniques on seed germination behavior of maize inbred lines (*Zea mays* L.). *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, v.3, p.22-5, 2008.
- NASCIMENTO, W. M.; WEST, S. H. Priming and seed orientation affect emergence and seed coat adherence and seedling development of muskmelon transplants. *Horticulture Science*, v.33, p.847-8, 1998.
- NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J.; HUBER, D. J. Ethylene evolution and endo- $\beta$ -mannase activity during lettuce seed germination at high temperature. *Scientia Agrícola*, v.61, p.156-63, 2004.
- NASCIMENTO, W. M. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças visando à germinação em condições de temperaturas baixas. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.23, abr. 2005.
- OLIVEIRA, A. S.; SILVA-MANN, R.; SANTOS, M. F.; GOIS, I. B.; BARRETO, M. C. V. Condicionamento osmótico em sementes de milho doce submetidas ao armazenamento. *Revista Ciência Agronômica*, v.38, p.444-8, 2007.
- OZBINGOL, N.; CORBINEAU, F.; GROOT, S. P. C.; BINO, R. J.; COME, D. Activation of the Cell Cycle in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Seeds during osmoconditioning as related to temperature and oxygen. *Annals of Botany*, v.84, p.245-51, 1999.
- PINEDO, G. J. V.; FERRAZ, I. D. K. Hidrocondicionamento de *Parkia pendula* [Benth ex Walp]: Sementes com dormência física de árvore da Amazônia. *Revista Árvore*, v.32, p.39-49, 2008.
- PINTO, L. V. A.; SILVA, E. A. A. da; DAVIDE, A. C.; MENDES DE JESUS, V. A.; TOOROP, P. E.; HILHORST, H. W. M. Mechanism and control of *Solanum lycocarpum* seed germination. *Annals of Botany*, London, v.100, p.1175-87, 2007.
- POTTERS, G.; PASTERNAK, T. P.; GUISEZ, Y.; PALME, K. J.; JANSEN M. A. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, v.12, p.98-105, 2007.
- POWEL, A. A.; YULE, L. J.; JUNG, H. C.; GROOT, P. C. The influence of aerated hydration seed treatment on seed longevity as assessed by the viability equation. *Journal Experimental of Botany*, n.353, p.2031-43, 2000.

- QUEIROZ, S. E. *Mecanismo e controle da germinação de sementes de Genipa americana* L. Lavras, 2009. 51fls. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras.
- ROUHI, H. R.; SURKI, A. A.; SHARIF-ZADEH, F.; TAVAKKOL AFSHARI, R.; ABOUTALEBIAN, M. A.; AHMADVAND, G. Study of Different Priming Treatments on Germination Traits of Soybean Seed Lots. *Notulae Scientia Biologica*, v.3, p.101-8, 2011.
- SANCHEZ, R. A.; DE MIGUEL, L.; MERCURI, O. Phytochrome control of cellulase activity in *Datura ferox* L. seeds and its relationship with germination. *Journal Experimental Botany*, v.37, p.1574-80, 1986.
- SILVA, E. A. A.; TOOROP, E. P.; VAN AELST, A. C.; HILHORST, H. W. M. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rub) seed germination. *Planta*, Berlin, v.220, n.2, p.251-61, 2004.
- SOEDA, Y.; KONINGS, C. J. M.; VORST, O.; HOUWELINGEN, A. M. M. L.; STOOPEN, G. M.; MALIEPAARD, C.; KODDE, J.; BINO, R.; GROOT, S.; GEEST, A. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiology*, v.137, p.354-68, 2005.
- SRINIVASAN, K.; SAXENA, S.; SINGH, B. B. Osmo and hidropriming of mustard seeds to improve vigour and some biochemical activities. *Seed Science and Technology*, v.27, p.785-93, 1999.
- SRIVASTAVA, A. K.; LOKHANDE, V. H.; PATADE, V. Y.; SUPRASANNA, P.; SJAHRI, R.; D'SOUZA, S. F. Comparative evaluation of hydro-, chemo-, and hormonal priming methods for imparting salt and PEG stress tolerance in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Acta Physiologia Plantarum*, v.32, p.1135-44, 2010.
- STILL, D. W.; BRADFORD, K. G. Endo- $\beta$ -mannanase activity from individual tomato endosperm caps and radicle tip in relation to germination rates. *Plant Physiology*, v.113, p.21-9, 1997.
- TOOROP, P. E.; VAN AELST, A. C.; HILHORST, H. W. M. The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. *Journal Experimental Botany*, v.5, p.1371-9, 2000.
- TOOROP, P. E. *The role of endo- $\beta$ -mannanase activity in tomato seed germination*. Netherlands: Wageningen University, 1998.
- TOOROP, P. E.; BEWLEY, J. D.; HILHORST, H. W. M. Endo- $\beta$ -mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. *Planta*, v.200, p.153-8, 1996.
- TOOROP, P. E.; VAN AELST, A.; HILHORST, H. W. M. Endosperm cap weakening and endo- $\beta$ -mannanase activity during priming of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. MoneyMaker) seeds are initiated upon crossing threshold water potential. *Seed Science Research*, v.8, p.483-91, 1998.

- TOOROP, P. E.; BEWLEY, J. D.; HILHORST, H. W. M. Endo- $\beta$ -mananase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. *Planta*, Berlim, v.200, n.2, p.153-8, 1996.
- VARIER, A.; VARI, A. K.; DADLANI, M. The subcellular basis of seed priming. *Current Science*, v.99, p.450-6, 2010.
- VENKATASUBRAMANIAN, A.; UMARANI, R. Evaluation of seed priming methods to improve seed performance of tomato (*Lycopersicon esculentum*), egg plant (*Solanum melongena*) and chilli (*Capsicum annum*). *Seed Science & Technology*, v.35, p.487-93, 2007.
- WAHID, A.; SHABBIR, A. Induction of heat stress tolerance in barley seedlings by pre-sowing seed treatment with glycinebetaine. *Plant Growth Regulation*, v.46, p.133-41, 2005.
- WAHID, A.; PARVEEN, M.; GELANI S.; BASRA, S. M. A. Pretreatment of seeds with  $H_2O_2$  improves salt tolerance of wheat seedling by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. *Journal Plant Physiology*, n.164, p.283-94, 2007.
- WATKINS, J. T.; CANTLIFFE, D. J. Mechanical resistance of the seed coat and endosperm during germination of *Capsicum annum* at low temperature. *Plant Physio.*, v.72, p.146-50, 1983.
- WELBAUM, G. E.; MUTHUI, W. J.; WILSON, J. H.; GRAYSON, R. L.; FELL R. D. Weakening of muskmelon (*Cucumis melo* L.) V. Water relations of imbibition and germination. *Plant Physiology*, v.46, p.391-400, 1995.

### 3

## Tecnologia de aplicação e inovações voltadas ao uso racional de defensivos agrícolas em culturas destinadas à produção de bioenergia

*Caio Antonio Carbonari,  
Edivaldo Domingues Velini,  
Ulisses Rocha Antuniassi*

### Introdução

A produção de energia a partir da biomassa vegetal é, à luz do conhecimento atual, a alternativa mais viável para a substituição dos combustíveis fósseis. Nesse contexto, o Brasil apresenta destaque no cenário mundial com ampla produção de energia por fontes renováveis, com vasto uso de biomassas vegetais. Entre as fontes de energia primária no Brasil, destacam-se os produtos provenientes da cana-de-açúcar e a lenha, respectivamente responsáveis por 18,8% e 10,2% da energia primária brasileira (Empresa de Pesquisa Energética, 2010). Assim, as culturas da cana-de-açúcar e do eucalipto, que é a principal espécie florestal plantada no Brasil, destacam-se no país como culturas de grande importância quanto à produção de bioenergia.

A cana-de-açúcar sobressai como uma das culturas mais notáveis do país, produzindo matéria-prima para a indústria sucroalcooleira e cogeração de energia elétrica. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma área plantada de aproximadamente 8 milhões de ha, sendo 4,35 milhões de ha somente no estado de São Paulo (Companhia Nacional de Abastecimento – Conab, 2011). Essa área representa um aumento de 8,4% do obtido na safra passada, ou seja, uma quantidade de 674 mil hectares adicionais da cultura.

A agroindústria canavieira está plenamente implantada e em expansão no Brasil. Nas últimas décadas, a indústria canavieira tem demonstrado grande capacidade de agregar valor a coprodutos do álcool e do açúcar, como a vinhaça (como fertilizante), a torta de filtro, o bagaço (matéria-prima industrial, alimentação animal e geração de energia) e a palhada (geração de energia). A tendência para os próximos anos é que cada unidade industrial destinada à transformação da cana produza, além do açúcar e do álcool, energia, créditos de carbono e um grande número de matérias-primas industriais.

A palhada é o coproduto mais recente da cultura e a sua acumulação no campo foi desencadeada pela alteração do método de colheita. A colheita mecanizada da cana sem queima da palha deu origem a um novo sistema de produção denominado de cana crua. A colheita tradicional com queima da palha deverá estar extinta em futuro próximo, em função de pressões ambientais e trabalhistas. O sistema de cana crua já é utilizado de maneira predominante nos canaviais do estado de São. As bases para o uso da palhada para a produção de energia ou para fins industriais ainda estão sendo criadas. Esse resíduo normalmente supera  $10\text{t ha}^{-1}$  de biomassa no campo, justificando os esforços para o seu uso.

Do mesmo modo, o plantio de eucalipto assume grande importância nacional pela geração de matéria-prima para a indústria e geração de energia. De acordo com ABRAF (2010), 56% (2.534.240 ha) das áreas com florestas plantadas de eucalipto no Brasil se localizam na região Sudeste, com destaque para o estado de Minas Gerais (1.300.000 ha) seguido por São Paulo (1.029.670 ha), respectivamente, com participações de 29% e 23% do total do país. A expansão de ambas as culturas ocorre em áreas ocupadas anteriormente por outras culturas, menos rentáveis, particularmente em pequenas propriedades, assim como em áreas recém-desmatadas.

Outras duas culturas de grande destaque em termos de produção de bioenergia são a soja e o milho. O óleo de soja é utilizado na produção de 86% do biodiesel consumido no Brasil (ANP, 2011). Desde o início de 2010, o biodiesel é adicionado ao óleo diesel na proporção de 5% em todo o território nacional. O milho constitui a base para o programa de produção de etanol nos EUA, o maior produtor mundial desse combustível.

As quatro culturas citadas, cana, eucalipto, soja e milho são as de maior relevância para a produção de bioenergia no Brasil (as três primeiras) e no

mundo. Culturas como beterraba açucareira, mamona, dendê, girassol, pinhão-manso, canola são também importantes em termos de Brasil e de mundo, mas em um nível inferior às quatro destacadas neste texto.

Algumas críticas à produção de bioenergia são recorrentes. A primeira delas refere-se ao fato das culturas produtoras de energia, competirem em área e recursos com cultivos produtores de alimentos. Esse risco de fato existe, mas é minimizado quando a cultura em questão permite o uso com mais de uma finalidade como é o caso da soja e do milho. No caso dessas duas culturas, apenas parte dos grãos é utilizada na produção de combustíveis, sendo que o restante é destinado à produção de alimentos destinados a animais, principalmente. Na medida em que o cultivo de ambas para a produção de energia é estimulado, a produção de alimentos é, na mesma medida, beneficiada.

Quanto à cana-de-açúcar, praticamente toda a biomassa é destinada à produção de energia havendo as seguintes possibilidades principais: 1) energia metabólica a partir da sacarose; 2) etanol a partir da sacarose; 3) etanol de segunda geração produzido a partir do bagaço e de outros resíduos como a palhada; 4) geração de energia elétrica a partir do bagaço e da palhada. Quando da renovação da cultura (da ordem de 15% ao ano), é comum a rotação da cana com culturas anuais como amendoim e soja, havendo a possibilidade de produzir alimentos em áreas tradicionalmente cultivadas com a espécie.

No caso do eucalipto, os sistemas de integração pastagem, lavoura e pecuária são alternativas promissoras para a produção de madeira de modo harmonioso com a produção de alimentos, mas são sistemas cujo desenvolvimento ainda demanda intensa atividade de pesquisa para otimizá-los. O eucalipto é a alternativa mais eficiente para a produção de lenha, que já corresponde a 10,2% da matriz energética brasileira (Empresa de Pesquisa Energética, 2010) e cresce a sua utilização na produção de energia elétrica. Nesse último caso, o maior desafio corresponde ao desenvolvimento de sistemas de cultivo e de colheita voltados a essa nova utilização da cultura.

Outra crítica frequente à produção de bioenergia refere-se à elevada demanda de insumos e outros recursos necessários à produção da biomassa com esse fim. O primeiro fator de produção sempre mencionado é a água. De fato, a preocupação se justifica quando se considera que mais de dois terços de toda a água consumida pela humanidade é utilizada para abastecer



sistemas de irrigação. Nesse aspecto, os sistemas de produção de soja, milho, cana e eucalipto, desenvolvidos no Brasil são bastante eficientes, pois a grande maioria das áreas cultivadas são áreas de sequeiro, ou seja, sem irrigação. Em outros países, o uso de irrigação em soja e milho, principalmente, é bastante frequente, justificando a preocupação apresentada.

O aumento do uso de fertilizantes para produzir bioenergia também é uma grande preocupação em função da possibilidade da exaustão das rochas e fontes de energia utilizadas na sua produção. Nesse aspecto, os sistemas de produção em uso no Brasil também são modelos de eficiência. Praticamente todos os produtores de soja lançam mão de fixadores simbióticos de nitrogênio inoculados nas sementes das culturas e que praticamente dispensam o uso desses fertilizantes na cultura. Em cana, o uso de fertilizantes tem sido minimizado pelo retorno da grande maioria dos resíduos como vinhaça e torta, ao campo, reduzindo a necessidade de adubação da cultura.

Em eucalipto, vem sendo muito bem-sucedido o melhoramento genético da cultura, associado à clonagem dos melhores genótipos, que tem permitido a obtenção de clones mais produtivos, rústicos e com menor demanda de nutrientes por tonelada de madeira produzida. Apesar do grande esforço feito pelas instituições de pesquisa, pelas indústrias de fertilizantes e pelos produtores, o Brasil ainda importa cerca de 25%, 50% e 90% de todo o nitrogênio, fósforo e potássio consumidos para fins agrícolas. Talvez seja esse o ponto de maior vulnerabilidade de nossa produção agropecuária; não há como mantê-la sem a importação de fertilizantes.

Outra crítica recorrente ao uso dessas quatro culturas agrícolas na produção de bioenergia refere-se ao uso de defensivos agrícolas com possíveis efeitos negativos sobre a qualidade dos produtos obtidos e, principalmente, sobre o meio ambiente. É sobre esse tema que versará este texto.

Os defensivos agrícolas desempenham um papel de grande importância na agricultura, contribuindo para redução dos agentes nocivos e aumento na produção e qualidade dos produtos agrícolas, desde que aplicados de maneira racional, evitando-se a contaminação do solo e da água, os danos à saúde humana e animal e o surgimento de pragas, plantas e patógenos resistentes (Cunha et al., 2003). Em termos de valores despendidos com defensivos agrícolas, as informações podem sofrer alterações a cada safra, mas as participações das três principais classes de produtos (herbicidas, in-

seticidas e fungicidas) têm se mantido próximas a 40%, 30% e 15% respectivamente. Em termos de culturas, as participações da soja, milho e cana têm sido próximas a 45%, 12% e 8% respectivamente. Uma quarta cultura de grande destaque é a do algodão com participação no mercado similar à da cana-de-açúcar. Não foram encontradas informações sobre o mercado total de defensivos agrícolas na cultura do eucalipto.

As culturas da soja e milho têm se mantido em posição de destaque no uso de defensivos agrícolas em função dos seguintes fatores: 1) da área total de cultivo; 2) da extensão das áreas cultivadas na maioria dos países, em regiões do Brasil e em sistemas de produção, dificultando o uso do controle manual, por exemplo; 3) amplo uso do plantio-direto (predominante no Brasil), inviabilizando o uso do cultivo mecânico; 4) aumento do número de aplicações de herbicidas em função da elevada utilização de linhagens transgênicas que são resistentes a herbicidas de pós-emergência sem efeito residual (exemplos: glyphosate e glufosinate); 5) presença de plantas daninhas resistentes a herbicidas. Especificamente para a soja, destaca-se a recente introdução no Brasil da ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, que pode reduzir drasticamente a produtividade da cultura se não forem adotadas medidas de controle.

Em cana-de-açúcar, há amplo predomínio dos herbicidas na composição do mercado total de defensivos agrícolas, mas também são comuns as aplicações de inseticidas no combate de pragas e de maturadores. No caso dos maturadores, a aplicação tem sido feita com o emprego de aeronaves e vários dos compostos utilizados têm também ação como herbicida (exemplos: glyphosate; sulfometuron-metil e fluazifop-p-butil). Especificamente quanto aos herbicidas, predominam os produtos aplicados em pré-emergência ou pós-emergência com efeito residual no solo para que o controle de plantas daninhas possa ser feito por períodos que podem ultrapassar 180 dias. Em pós-emergência, além da aplicação dos maturadores, há as aplicações localizadas (catação química) e as aplicações de glyphosate direcionadas à s folhas da cana para eliminação das soqueiras quando da renovação ou substituição da cultura.

Quando são aplicados herbicidas com ação de pré-emergência, o alvo preferencial pode ser o solo ou a palhada. As aplicações sobre a palhada têm predominado em função das restrições à queimada da cultura antes da colheita e do uso crescente do sistema de colheita mecanizada. Em áreas de

cana colhida crua, sem queima das folhas, a quantidade de palha que permanece sobre o solo pode ultrapassar a  $10 \text{ t ha}^{-1}$ , e esta camada de resíduo interfere de modo decisivo na dinâmica e persistência de herbicidas, de outros defensivos e de fertilizantes nas áreas de produção. Segundo as informações referentes a 2009, o mercado de defensivos agrícolas em cana-de-açúcar movimentou US\$ 768,4 milhões (9,5% das vendas no país), sendo que, desse total, 73,5% foram gastos com herbicidas, 22,8% com inseticidas e 3,7% com fungicidas (Souza; Macedo, 2009).

Em eucalipto, também predomina amplamente o uso de herbicidas, com destaque para o glyphosate, que tem como principal modalidade de uso, a aplicação direcionada às plantas daninhas para que não intoxique a cultura. O glyphosate também pode ser aplicado previamente à colheita para melhorar as condições de trabalho para os envolvidos nessa operação, na desinfestação inicial das áreas antes do plantio da cultura e na própria eliminação da cultura (aplicado às rebrotas ou diretamente ao toco). Outros exemplos de herbicidas de amplo uso na cultura são: sulfentrazone, isoxaflutole e flumioxazin. Nos últimos anos, a ocorrência de pragas e doenças também tem levado à necessidade de uso de inseticidas e fungicidas nas áreas de produção da cultura, além dos viveiros de produção de mudas.

## **Processos envolvidos nas perdas de defensivos agrícolas**

Depois da aplicação de um defensivo agrícola, vários processos físicos, químicos e biológicos determinam seu comportamento. O destino de herbicidas no ambiente é governado por processos de retenção (adsorção, absorção), de transformação (decomposição, degradação) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação, escoamento superficial), e por interações desses processos. Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental de herbicidas, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas e, nas características e condições ambientais, podem afetar esses processos. Condições meteorológicas, composição das populações de microrganismos no solo, presença ou ausência de plantas, localização do solo na topografia e práticas de manejo dos solos podem também afetar o destino de defensivos agrícolas no ambiente (Spadotto, 2002).

## Deriva e uniformidade nas aplicações de defensivos agrícolas

Quando se realiza a aplicação de determinado defensivo agrícola, geralmente, busca-se colocar a quantidade certa de ingrediente ativo no alvo desejado, com máxima eficiência e de maneira mais econômica possível, sem afetar o meio ambiente (Durigan, 1989). A deriva é definida como parte da pulverização agrícola que é carregada para fora da área-alvo, pela ação do vento (Miller, 1993) ou pela volatilização do produto. Entre os fatores que interferem na ocorrência da deriva, podem ser mencionadas as características do herbicida, o tipo de equipamento, a calibração, o tipo de pontas de pulverização, as técnicas de aplicação, as condições meteorológicas e a habilidade do operador (Costa et al., 2007; Cunha et al., 2003; Ozkan, 2011; Penckowski; Podolan; Lópezovejero, 2003; Viana et al., 2007).

A deriva em aplicações de defensivos agrícolas pode ser considerada como um dos maiores problemas da agricultura atualmente, tendo em vista o grande aumento no consumo e dependência desses produtos para a proteção das culturas agrícolas. Dessa forma, altos níveis de perdas durante a aplicação de um defensivo agrícola implicam em uma menor eficácia biológica e um maior risco ambiental. Segundo Friedrich (2004), estima-se que cerca de 50% dos defensivos agrícolas são desperdiçados devido às más condições de aplicação. Carbonari e colaboradores (2011) observaram perdas entre 2% e 62 % do volume total da calda de herbicidas aplicados em áreas de cana-de-açúcar, em função de falhas operacionais e/ou condições climáticas inadequadas no momento da aplicação.

Dessa forma, além dos prejuízos diretos para o produtor que realiza a pulverização, causados pela menor deposição do produto aplicado sobre o alvo, existem outros motivos que tornam a deriva indesejável, como o pagamento de indenizações por perdas em áreas vizinhas, a contaminação de alimentos, a contaminação do ar e da água, efeitos prejudiciais à saúde e segurança do ser humano e animais, entre outros.

A Tabela 3.1 apresenta resultados de pesquisa cujo objetivo foi a determinação do índice de deriva de aplicações aéreas e terrestres em condições consideradas próximas dos limites operacionais quanto às condições climáticas. Nessas aplicações, é possível observar que o uso de gotas finas em condições limites pode resultar em níveis elevados de deriva, com potencial tanto para reduções significativas das doses reais dos produtos a campo como para o risco de deriva direta de produtos em áreas vizinhas, o que pode efetivamente causar danos econômicos e ambientais.

Tabela 3.1 – Índices de perdas em aplicações aéreas e terrestres de acordo com as condições climáticas no momento das aplicações

Sistema	Volume (L/ha)	Adjuvante	Gotas	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Vento (km/h)	Perdas (%)
Aéreo	12	OV 10%	Finas	25,4	76,0	7,7 – 11,9	28,8
Aéreo	30	–	Finas	29,5	74,5	13,0 – 24,0	40,1
Terrestre	30	OV 5%	Finas	27,6	73,7	11,0 – 14,0	39,8
Terrestre	50	–	Finas	29,5	62,5	8,5 – 24,1	42,5

Fonte: Antuniassi et al., 2009

A classificação de valores de deriva como “aceitáveis” ou “inaceitáveis” é uma prática difícil, pois a variabilidade de condições de trabalho a campo é muito grande, dificultando a determinação de parâmetros de comparação. Em tese, o ideal é que a deriva fosse nula, mas o cotidiano das aplicações mostra que é extremamente frequente em uma situação normal de campo que algum nível de deriva sempre ocorra.

Cada sistema produtivo apresenta peculiaridades, as quais induzem a diferentes níveis de perdas nas aplicações. A prática agrônômica tem mostrado que índices totais de perdas acima de 50% podem ser aceitáveis para alguns tipos de aplicações em fruticultura (turboatomizadores de fluxo divergente, por exemplo), enquanto níveis próximos a estes seriam inaceitáveis numa aplicação com pulverizador de barras na cultura da soja, por exemplo. Mesmo dentro de um único mercado, o índice total de perdas considerado “aceitável” apresenta variações práticas. Aplicações de desseccantes como glyphosate e 2,4-D são usualmente realizadas com extremo cuidado, frequentemente utilizando pontas com indução de ar de gotas grossas ou muito grossas, e por isso o nível de deriva total é muito baixo, em geral inferior a 10%. Já em uma aplicação de fungicidas ou inseticidas com gotas finas, visando maximizar a cobertura das folhas em soja, um nível de perdas totais da ordem de 20% a 25% poderia ser considerado normal, dada a grande suscetibilidade dessas gotas finas, no que se refere aos fatores que causam a deriva.

Assim, de acordo com os dados de pesquisa apresentados na Tabela 3.1, observa-se que a aplicação aérea a 12 L ha<sup>-1</sup> foi realizada em condições climáticas próximas da normalidade, dentro das recomendações usuais, e o resultado de 28,8% de perdas totais poderia ser considerado “um pouco acima do aceitável”. Por outro lado, as demais aplicações apresentadas na

Tabela 3.1 foram todas realizadas com excesso de vento e/ou temperaturas próximas dos limites operacionais, elevando os valores de deriva a patamares que podem ser considerados inaceitáveis (próximos ou acima de 40% de perdas).

A detecção da deriva tem grande importância, pois, enquanto as perdas ocasionadas por esse fator não forem facilmente identificadas, produtores de culturas sensíveis em áreas adjacentes podem ter substanciais reduções na produção sem identificar a verdadeira causa (Schroeder; Cole; Dexter, 1983). Matthews (1999) ressalta a preocupação mundial com os efeitos que a deriva pode provocar fora das áreas tratadas, cujo resultado tem sido a necessidade de instalação de áreas de proteção (*buffer zones*) para cursos d'água e outras áreas sensíveis.

Eliminar completamente a deriva é bastante improvável, no entanto, esta pode ser minimizada usando-se técnicas e métodos de aplicação corretos, tamanho de gotas adequados, limpeza e regulagem do equipamento, aplicação em condições climáticas adequadas e/ou uso de formulação apropriada. No entanto, o que se observa no campo é a falta de informação a respeito da tecnologia de aplicação (Costa et al., 2007).

Além da deriva, em aplicações com barra de pulverização, a deposição do produto é extremamente variável devido a movimentos verticais e horizontais dessa barra. Para alcançar um melhor desempenho na pulverização com barras longas no campo, onde a superfície do solo é ondulada, Nation (1977) sugere mudanças nos modelos das barras e no seu acoplamento visando à diminuição dos movimentos verticais e horizontais. Speelman e Jansen (1974) estudaram os efeitos da movimentação da barra na distribuição da calda de pulverizadores e concluíram que as suas vibrações afetam de maneira negativa a distribuição da calda, principalmente nas pontas da barra.

Porskamp e Van Zuydam (1992) verificaram que as movimentações verticais e horizontais de 20 cm aumentam o coeficiente de variação em 48% a mais no centro e 78% na ponta da barra. Verificaram, também, que o movimento horizontal da barra de pulverização é mais prejudicial que o movimento vertical. Essa variação nos depósitos pontuais dentro da área de aplicação contribui de forma bastante significativa para redução de eficácia da maioria dos defensivos agrícolas disponíveis, o que acaba implicando na necessidade de aumento nas doses desses produtos para uma ação efetiva.

## Perdas por volatilização e fotodegradação

A pressão de vapor é a pressão exercida por um vapor em equilíbrio com um líquido, a uma determinada temperatura. Essa característica indica o grau de volatilização do defensivo agrícola, ou sua tendência em se perder na forma de gás na atmosfera. Quanto maior a pressão de vapor do defensivo agrícola, maior o seu grau de volatilização e maiores são as chances de perdas para a atmosfera (Oliveira, 2001; Monaco; Weller; Ashton, 2002). Em condições de alta temperatura e baixa umidade relativa do ar, o potencial de volatilização é maior, sendo essas condições inapropriadas para a aplicação de defensivos agrícolas classificados como voláteis. Quanto maior a pressão de vapor (Tabela 3.2), maior é seu potencial de volatilização.

Tabela 3.2 – Classificação da volatilidade em função da pressão de vapor

Classificação	Pressão de vapor (mm Hg)
Não volátil	$< 10^{-8}$
Pouco volátil	$10^{-7}$ a $10^{-5}$
Medianamente volátil	$10^{-4}$ a $10^{-3}$
Muito volátil	$> 10^{-2}$

Outro mecanismo importante quanto às perdas de defensivos agrícolas após a aplicação é a fotodegradação ou fotodecomposição, desencadeada quando a molécula do defensivo agrícola absorve a energia da radiação solar excitando os seus elétrons, o que acarretar na ruptura de ligações (Monaco; Weller; Ashton, 2002). Esse fenômeno pode causar a desativação das moléculas dos defensivos agrícolas, resultando em perdas significativas dos produtos. Cada molécula é sensível a comprimentos de ondas específicos, em geral, na faixa do ultravioleta. Na prática, a fotodegradação é um fenômeno que ocorre para produtos que apresentam picos de absorção de comprimentos de onda entre 295nm e 400 nm (Christoffoleti; Ovejero, 2005).

Para muitos herbicidas são conhecidos os efeitos da fotodegradação quando aplicados diretamente sobre o solo, sendo estes agravados em condições de solo seco, conforme Velini (1992). Por sua vez, nota-se um crescente aumento de áreas cultivadas sobre algum tipo de cobertura morta (palhada), como plantio direto de culturas anuais, cultivo mínimo em reflorestamentos e cana crua, sendo, atualmente, o herbicida aplicado sobre es-

ses restos vegetais. Vale ressaltar que em cana-de-açúcar, por exemplo, uma prática comum é a aplicação de herbicidas pré-emergentes imediatamente após a colheita que é realizada com frequência em períodos do ano de maior restrição hídrica (junho a setembro).

A aplicação de herbicidas de ação residual sobre palhadas altera significativamente sua dinâmica no ambiente, pois sua chegada ao solo é dependente da ocorrência de chuvas. Assim, a permanência dos herbicidas sobre a palhada potencializa os efeitos da fotodegradação pela maior exposição dos produtos à radiação solar. Segundo Locke e Bryson, (1997), um herbicida aplicado sobre a palhada é interceptado pela superfície da palha ali depositada e torna-se vulnerável à degradação causada pela volatilização e/ou fotodecomposição, até que seja lixiviado para o solo. Por conseguinte, a fotodegradação de herbicidas conhecidos por serem foto estáveis no solo, pode ser alterada e potencializada quando da aplicação sobre a palhada, consequência da maior exposição aos raios solares.

## **Perdas por lixiviação no solo**

Na maioria das situações, uma parcela muito significativa dos defensivos agrícolas aplicados, tem como destino final o solo. No solo, os defensivos agrícolas em geral e particularmente os herbicidas com ação residual podem sofrer processos de sorção, lixiviação e/ou degradação por efeitos físicos, químicos e biológicos, além de ser absorvidos pelas plantas daninhas e/ou plantas cultivadas (Velini, 1992). Os defensivos agrícolas apresentam algumas características físico-químicas que, juntamente com as condições ambientais e atributos físicos, químicos e biológicos do solo, regem sua dinâmica no solo. Essas características são específicas para cada produto, mesmo para aqueles pertencentes ao mesmo grupo químico, e seu conhecimento é de fundamental importância para o sucesso na sua utilização.

Dentre as características que determinam o comportamento dos herbicidas no solo, as mais importantes são: constante de equilíbrio de ionização de um ácido ou base fraca ( $pK_a$ ); coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ); solubilidade em água; pressão de vapor e meia-vida do herbicida no solo. As constantes de ionização ácido/base ( $pK_a$  ou  $pK_b$ ) de moléculas que possuem caráter ácido fraco ou base fraca, respectivamente, representam a sua tendência de ionização numa determinada faixa de valores de pH.



Sendo assim, o  $pK_a$  é o pH no qual metade das moléculas estão ionizadas e metade não ionizadas. Esse parâmetro mostra o valor de pH em que as formas ionizadas e não-ionizadas do herbicida ocorrem em iguais concentrações, respondendo, cada uma das formas, por 50% da concentração total do composto (Procópio et al., 2003). Conforme a constante de equilíbrio de ionização, os herbicidas iônicos podem ser classificados em herbicidas ácidos ou herbicidas básicos (Oliveira, 2001; Regitano et al., 2002).

O coeficiente de partição ( $K_{ow}$ ) representa a proporção entre as quantidades de um determinado herbicida que migram para um solvente orgânico apolar (geralmente o octanol) ou para a água (polar), quando adicionado e agitado em frascos em que se encontram quantidades determinadas dessas substâncias utilizadas como solventes, ou seja, os valores de  $K_{ow}$  referem-se à medida da intensidade da afinidade da molécula pela fase polar e apolar.

A solubilidade em água de uma molécula de herbicida é caracterizada pela quantidade do herbicida dissolvida em água pura, ou seja, indica a proporção de herbicida que poderá estar disponível na solução do solo, podendo ser absorvida por raízes e sementes em germinação, a uma determinada temperatura. A quantidade de herbicida na solução do solo é diretamente proporcional ao conteúdo de água no solo. A quantidade de espaços livres para o herbicida na solução diminui em solos secos, e assim menor quantidade de herbicida fica livre na solução do solo (maior sorção). Em condições de seca, as plantas são expostas a menor quantidade de herbicida e assim menor quantidade é absorvida pelas plantas daninhas. Quando a umidade no solo é restabelecida ocorre a dessorção do herbicida voltando a solução do solo (Hartzler, 2009). Regitano e colaboradores (2002) observaram uma redução na mobilidade do herbicida imazaquin em função do aumento no período em que o solo foi mantido seco após aplicação do herbicida e antes do início da simulação de chuvas.

A sorção e a dessorção de herbicidas no solo regulam o fenômeno de retenção, influenciando o transporte, a transformação e a biodisponibilidade dessas moléculas no solo. Esses processos estão diretamente relacionadas à eficácia dos herbicidas no controle das plantas daninhas e ao risco de contaminação ambiental por esses compostos. Segundo Andrea e Luchini (2002), a sorção de defensivos agrícolas no solo também é importante, principalmente por estar relacionada diretamente com os processos de disponi-

bilidade para a atividade do composto, ataque microbiano e biodegradação e inversamente com a possibilidade de lixiviação e contaminação de águas.

O mecanismo de sorção de herbicidas, por estes se tratarem de moléculas orgânicas nos mais variados arranjos, é muito mais complexo do que a dos íons que servem como nutrientes para as plantas (Prata; Lavorenti, 2000). Forças físicas como pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, forças eletrostáticas, ligações covalentes e interações hidrofóbicas são os principais mecanismos que podem contribuir com a sorção dos herbicidas, sendo que estes mecanismos podem atuar concomitantemente na sorção de uma mesma molécula (ibidem). Quanto menor o coeficiente de sorção do composto nos colóides do solo ( $K_d$ ), maior é a sua lixiviação potencial. O valor de  $K_d$  pode ser determinado em laboratório, agitando-se uma amostra do solo com uma solução aquosa do defensivo agrícola. Em situação de equilíbrio tem-se:  $K_d = \text{concentração do composto nos sólidos do solo} / \text{concentração do composto na água}$ . Briggs (1981) determinou o valor de  $K_d$  de dezenas de defensivos agrícolas não-iônicos, em vários solos da Inglaterra, tendo observado uma estreita relação entre o valor de  $K_d$  do composto, sua polaridade, expressa na forma do seu coeficiente de partição entre n-octanol e água, e o percentual de matéria orgânica do solo ( $K_d = 0,045 \times K_{ow}^{0,52} \times \%M.O.$ ). Essa relação tem sido amplamente usada para a previsão do valor de  $K_d$  de defensivos agrícolas não-iônicos em solos.

No entanto, a natureza orgânica dos herbicidas e sua alta afinidade pela matéria orgânica, tornam o teor de carbono orgânico do solo o melhor parâmetro isolado para prever o coeficiente de sorção padronizado para o carbono orgânico ( $K_{oc}$ ) (Oliveira, 2001; Christoffoleti, 2005). Para o amicarbazone, por exemplo, são encontrados valores de  $K_{oc}$  entre 23 e 27, o que o classifica, segundo Gelber e Spadotto (2004), como um herbicida com força de adsorção fraca e conseqüentemente com alta mobilidade no solo.

Em solos que apresentam altos teores de argila, de matéria orgânica ou ambos, verifica-se maior adsorção e persistência de herbicidas, seguido por baixos índices de desorção, lixiviação e degradação destes (Li et al., 2003; Hager; Nordby, 2004; Si et al., 2006). Firmino et al. (2008) avaliando a sorção do imazapyr em solos com diferentes texturas, observou em solos arenosos e com baixos teores de matéria orgânica, uma baixa sorção do herbicida, o que predispõe o produto à lixiviação no perfil do solo, podendo até mesmo contaminar mananciais de águas subterrâneas.

Um termo bastante utilizado na literatura é o chamado resíduo ligado, que é o nome dado à interação entre espécies químicas originadas ou não de interações xenobióticas com as substâncias húmicas do solo, sendo esses resíduos não passíveis de extração por métodos que não alterem significativamente a natureza da molécula (Fuhr, 1987). Segundo Prata e Lavorenti (2000), uma significativa proporção das moléculas dos defensivos agrícolas aplicadas na agricultura permanecem no solo como resíduos ligados.

A formação de resíduo ligado pode ter como consequências a diminuição da degradação do defensivo agrícola (Calderbank, 1989), a perda da sua atividade biológica e da sua identidade química, a alteração da sua absorção por plantas, e a alteração do escoamento superficial e da lixiviação desses defensivos agrícolas. A adição de materiais orgânicos oxidados ou estabilizados ao solo, como é o caso das substâncias húmicas, promove um aumento dos sítios sortivos do solo, o que contribui com a maior sorção e constituição de resíduos ligados, conforme Prata e Lavorenti (2000).

O tipo e conteúdo de argila, teor e características da matéria orgânica e umidade do solo afetam as interações do defensivo agrícola no solo (Levanon et al., 1993; Czapar; Kanvar; Fawcett, 1994). A matéria orgânica apresenta acentuada capacidade de sorver os defensivos agrícolas e isto reduz a atividade biológica no solo e a mobilidade dos compostos químicos a ele aplicados. A pronunciada reatividade da matéria orgânica está relacionada principalmente com sua elevada área superficial específica e presença de vários grupos funcionais, como carboxilas, hidroxilas e aminas, e estruturas alifáticas e aromáticas (Lee; Farmer, 1989; Stevenson, 1972; Stearman et al., 1989; Kuckuk et al., 1997).

Sistemas de manejo de solo afetam diferentemente o teor e a qualidade da matéria orgânica do solo, bem como a proporção de substâncias húmicas. Considerando que o tipo de manejo do solo pode influir no teor e características da matéria orgânica e das substâncias húmicas, diferenças na sorção das moléculas dos defensivos agrícolas são esperadas em solos submetidos a diferentes sistemas de manejo.

O processo de lixiviação refere-se ao movimento descendente dos herbicidas com a água na matriz do solo, sendo sua intensidade dependente das características físico-químicas do produto e das características de solo e clima. Para serem lixiviadas, as moléculas dos defensivos agrícolas devem estar na solução do solo ou adsorvidas a pequenas partículas, como argilas,

ácidos fúlvicos e húmicos de baixo peso molecular, aminoácidos, peptídeos e açúcares, entre outros (Oliveira, 2001).

A movimentação de defensivos agrícolas no perfil do solo ocorre em todas as direções e é dependente da direção do fluxo de água. Devido à ocorrência de grandes volumes de água de percolação nos solos após chuvas pesadas ou irrigações, a direção mais comum na qual o herbicida pode ser lixiviado é a descendente.

Segundo Velini (1992), a ocorrência da lixiviação é fundamental para a incorporação superficial da maioria dos herbicidas, atingindo sementes ou plantas em germinação; mas quando excessiva, pode carregá-los para camadas mais profundas do solo, limitando sua ação e podendo, inclusive, promover contaminação do lençol freático.

Carbonari (2009) observou para a aplicação do herbicida amicarbazone em cinco solos cultivados com cana-de-açúcar, com e sem a presença de palha na superfície, que o produto foi detectado em todas as camadas do solo (0 a 10, 10 a 20 e 20 a 40 cm de profundidade), o que demonstra uma grande mobilidade no solo. Em períodos de maior restrição hídrica foram observados, maiores concentrações de amicarbazone no solo nos tratamentos sem palha e com aplicação sob a palha. Em períodos de alta disponibilidade hídrica e em solos de textura arenosa e média, foram observadas maiores concentrações do herbicida na camada mais superficial do solo para a aplicação sobre a palha, o que demonstra uma menor lixiviação do produto no solo nessa condição.

Devido ao seu uso intensivo, os herbicidas são apontados como o grupo de defensivo agrícola mais frequentemente detectado em estudos de qualidade de águas superficiais e subterrâneas (Carter, 2000; Tanabe et al., 2001), sendo as áreas próximas ao cultivo de cana-de-açúcar de maior ocorrência de resíduos desses compostos, já que esta é uma das culturas que mais utiliza herbicidas no manejo de plantas infestantes (Southwick et al., 2002; Vivian et al., 2007).

Em solo cultivado com cana, na região nordeste do pantanal mato-grossense, foram detectados resíduos de ametryn na maioria das amostras coletadas em águas de superfície, embora em baixa concentração. Entretanto, em amostras de sedimentos, as concentrações foram superiores a  $4,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ . A elevada frequência de detecção de ametryn, juntamente com sua alta concentração em algumas amostras, foi atribuída, conforme os autores, ao

intenso cultivo de cana-de-açúcar no nordeste do pantanal, em que se utiliza esse herbicida (Laabs et al., 2002).

A lixiviação potencial dos defensivos agrícolas no solo pode ser determinada por alguns métodos diferentes, como por exemplo, por meio da percolação em colunas preenchidas com amostras deformadas ou indeformadas do solo. Assim, os estudos de lixiviação potencial, no Brasil, ficam restritos a colunas, modelos matemáticos e bioensaios. Segundo Vivian et al. (2007), estudos comumente conduzidos em laboratório, com objetivo de avaliar o potencial de lixiviação e contaminação de solo e água por herbicidas, nem sempre representam o comportamento real verificado em condições naturais *in situ*.

Além da lixiviação, outra forma de transporte de defensivos agrícolas é na água que se move sobre a superfície do solo, chamado de escoamento superficial, o qual tem sido considerado como um dos principais meios de contaminação de rios e lagos (Gaynor; Mactavish; Findlay, 1992; Lerch; Blanchard, 2003). O movimento da água carrega substâncias solúveis ou adsorvidas às partículas de solos erodidos. Estudos têm mostrado que perdas por essa via geralmente variam de 1% a 5%, dependendo das práticas culturais, solo, dimensão da área, declividade, extensão do declive, cobertura, umidade do solo e das propriedades dos defensivos agrícolas (Patty; Real; Grill, 1997).

Verifica-se, portanto, que a dinâmica de um defensivo agrícola no solo é bastante complexa e envolve diversos processos de perdas e imobilização, desde a aplicação, a interação com a palhada, quando esta se faz presente, e finalmente com a chegada ao solo.

## **Tecnologia de aplicação de defensivos agrícolas**

O tamanho de gotas e o volume de aplicação são fatores básicos que devem ser considerados em primeiro lugar para o planejamento de uma aplicação. Os demais fatores importantes, como o momento da aplicação, as condições climáticas, a recomendação do produto e as condições operacionais devem ser considerados em conjunto para que todo o sistema esteja ajustado, visando o máximo desempenho com o mínimo de perdas, sempre com o menor impacto ambiental possível. De maneira geral, os produtos com

ação sistêmica quando direcionados ao solo ou às folhas podem ser aplicados com gotas maiores. Isso facilita a adoção de técnicas para a redução de deriva, melhorando a segurança ambiental da aplicação e aumentando a sua eficiência. Se usadas de maneira correta, gotas maiores geralmente oferecem bom nível de depósito (quantidade de defensivo depositado nos alvos), apesar de não proporcionar as melhores condições de cobertura das folhas das culturas. Para os produtos de contato ou de menor ação sistêmica, o uso de gotas menores e/ou maior volume de calda é necessário, devido a maior dependência dessa técnica com relação à cobertura dos alvos.

O estudo das características dos alvos deve incluir a análise de outros fatores, como movimentação das folhas, estágio de desenvolvimento das plantas, cerosidade, pilosidade, rugosidade, face da folha em que a cobertura é mais importante (superior/inferior) e arquitetura geral da planta. Na diferenciação entre plantas como alvos de aplicações, a posição e o formato das folhas apresentam importância fundamental. Por exemplo, as folhas das monocotiledôneas são geralmente mais estreitas e se posicionam na vertical, enquanto as folhas das dicotiledôneas são mais largas e permanecem na horizontal. Esses fatores são fundamentais para a definição da retenção das gotas nas folhas e na própria eficiência de penetração dos defensivos nos tecidos vegetais. Por este motivo, em muitos casos, a tecnologia de aplicação mais adequada ao milho pode não ser a melhor para a soja, e vice-versa.

A cobertura dos alvos de uma aplicação pode ser definida pela fórmula de Courshee (1967):

$$C = 15 \frac{VRK^2}{AD}$$

Onde:

C = cobertura (% da área)

V = volume de aplicação (L/ha);

R = taxa de recuperação da calda nas folhas (% do volume aplicado)

K = fator de espalhamento de gotas

A = área foliar

D = diâmetro das gotas ( $\mu\text{m}$ )

Assim, em termos genéricos, para melhorar a cobertura de uma aplicação deve-se adotar gotas mais finas ou volumes maiores; na aplicação de

volumes mais baixos, as gotas mais finas devem ser preferidas, para que se consiga uma boa cobertura com a calda pulverizada; se a escolha recair sobre as gotas maiores, o volume de calda deve ser igualmente aumentado para que se possa garantir um nível mínimo de cobertura para o tratamento. Por esses motivos, um dos princípios básicos da tecnologia de aplicação é que não existe uma solução única que atenda todas as necessidades. É necessário, primordialmente, que a tecnologia seja ajustada para cada condição de aplicação.

Para que se faça o ajuste do tamanho das gotas e do volume de calda, várias ações podem ser planejadas dentro do manejo dos parâmetros de uma aplicação. Para reduzir o tamanho das gotas, as pontas de jato plano (leque) podem ser substituídas pelas pontas de jato plano duplo (duplo leque) ou cônico vazio; a pressão de trabalho das pontas pode ser aumentada e um adjuvante pode ser adicionado à calda (um surfatante, por exemplo). Para aumentar o tamanho das gotas, as pontas de jato plano (leque) podem ser substituídas pelas pontas de pré-orifício ou indução de ar; a pressão de trabalho pode ser reduzida e outro tipo de adjuvante pode ser adicionado à calda (um óleo ou um espessante de calda, por exemplo, cuja ação produza gotas de maior tamanho). No caso do volume de calda, sua variação pode ser feita tanto pela troca das pontas como pela variação da velocidade de deslocamento do pulverizador.

## Condições climáticas

Outro parâmetro fundamental para o sucesso do tratamento é a adequação da tecnologia de aplicação às condições climáticas. Para a maioria dos casos, devem ser evitadas aplicações com umidade relativa inferior a 50% e temperatura ambiente maior que 30°C. No caso do vento, o ideal é que as aplicações sejam realizadas com vento entre 3 e 10 km h<sup>-1</sup>. Ausência de vento também pode ser prejudicial, em função da chance de ocorrer ar aquecido com movimento ascendente, o que dificulta a deposição das gotas pequenas. Esses limites, entretanto, devem ser considerados e eventualmente flexibilizados de acordo com a tecnologia de aplicação que será utilizada. Como exemplo, o uso de gotas grossas ou muito grossas pode facilitar o trabalho um pouco além dos limites, sempre com o cuidado para que a aplicação não seja feita em condições muito extremas com relação ao clima.

Mesmo dentro das faixas de trabalho relativas a esses limites, as características da técnica utilizada devem ser consideradas no momento da tomada de decisão. Um exemplo de otimização da escolha do tamanho de gotas em função das condições climáticas (umidade e temperatura, nesse caso) pode ser observado na Tabela 3.3. Nessa forma de raciocínio, o princípio a ser utilizado é o da adoção da gota mais segura dentro dos limites de cada situação. Assim, se a umidade permite uma gota muito fina, mas a temperatura indica que o melhor seria uma gota fina, a gota maior (fina) deve ser a escolhida, por ser a mais segura para tal situação (menor risco de perdas por deriva e evaporação).

Tabela 3.3 – Exemplo de relação prática entre as condições climáticas e a escolha do tamanho das gotas

Fatores	Classes de gotas de acordo com as condições climáticas		
	Muito Finas ou Finas	Finas ou Médias	Médias ou Grossas
Temperatura	abaixo de 25°C	25 a 28°C	acima de 28°C
Umidade relativa	acima de 70%	60 e 70%	abaixo de 60%

Fonte: Antuniassi et al., 2005

O início da manhã, o final da tarde e a noite são períodos em que a umidade relativa é maior e a temperatura é menor, sendo considerados mais adequados para as aplicações. Na prática, é possível e recomendável a utilização de gotas finas nesses horários. Porém, é necessário um monitoramento das condições ambientais com o passar das horas do dia, pois se houver, por exemplo, um aumento considerável da temperatura (com redução da umidade relativa), o padrão de gotas precisa ser mudado (passando-se a usar gotas maiores). Nesse caso, o volume de aplicação deve ser aumentado, para não haver efeito negativo na cobertura dos alvos.

Chuva e orvalho são fatores climáticos que também requerem atenção no momento do planejamento das aplicações. No caso da chuva, recomenda-se bastante cuidado na observação do intervalo mínimo de tempo entre a aplicação e a ocorrência da chuva, visando permitir o tempo mínimo para a penetração e absorção dos ingredientes ativos. No caso do orvalho, a presença de água nas folhas pode causar interferência na técnica de aplicação. O risco de um eventual escorrimento está ligado ao uso de espalhantes (surfatantes) na caldas. Entretanto, existem situações, dependendo da técnica empregada e do tipo de defensivo utilizado, em que a ação do orvalho pode ser benéfica (muitos fungicidas se posicionam nesta situação).



A aplicação noturna apresenta vantagens no que se refere às condições climáticas (umidade, temperatura e vento mais adequadas à aplicação de gotas mais finas), mas essa opção deve considerar a possível existência de limitações técnicas relativas aos próprios defensivos, no que se refere às questões de eficiência e velocidade de absorção/penetração nas situações de ausência de luz ou baixas temperaturas.

## Tamanho de gotas

Atualmente, as gotas produzidas por uma ponta são classificadas como “muito finas”, “finas”, “médias”, “grossas” e “muito grossas” (em algumas normas de classificação de pontas existe também a classe “extremamente grossa”). Para a classificação de uma determinada ponta usando-se esse conceito, o seu diâmetro mediano volumétrico (DMV) – que é o diâmetro da gota que divide o volume das gotas pulverizadas em duas partes, de forma que a soma dos volumes das gotas de diâmetro menor seja igual à soma do volume das gotas de diâmetro maior, sendo medido em micrometros ( $\mu\text{m}$ ) – deve ser comparado ao obtido por pontas de referência avaliadas utilizando-se o mesmo método de determinação do tamanho das gotas. Tomando-se como base a norma ASAE S572 (ASAE, 2000), se uma ponta apresenta DMV inferior ao obtido para uma ponta 11001 operando a 4,5 bar, o spray é classificado como “gotas muito finas”; se o DMV é intermediário entre o obtido por uma ponta 11001 (operando a 4,5 bar) e uma ponta 11003 (operando a 3,0 bar), o spray é classificado como “gotas finas”; se o DMV é intermediário entre o obtido por uma ponta 11003 (operando a 3,0 bar) e uma ponta 11006 (operando a 2,0 bar), o spray é classificado como “gotas médias”; se o DMV é intermediário entre o obtido por uma ponta 11006 (operando a 2,0 bar) e uma ponta 8008 (operando a 2,5 bar), o spray é classificado como “gotas grossas” e, finalmente, se o DMV é maior do que o obtido por uma ponta 8008 operando a 2,5 bar, o spray é classificado como “gotas muito grossas”.

A classe de tamanho de gotas é um bom indicativo da capacidade da pulverização em cobrir o alvo e penetrar na massa da folhas. Gotas menores possuem melhor capacidade de cobertura (oferecem maior número de gotas/ $\text{cm}^2$ ), assim como propiciam maior capacidade de penetração, e são recomendadas quando é necessária boa cobertura e boa penetração. Entre-

tanto, gotas pequenas podem ser mais sensíveis à evaporação e aos processos de deriva. Na maioria dos sistemas de produção as gotas grossas são preferidas para aplicação de herbicidas de grande ação sistêmica, enquanto as gotas finas são mais utilizadas para inseticidas e fungicidas.

## **Novas tecnologias para a racionalização do uso de defensivos agrícolas**

### **Aplicação aérea de defensivos usando veículo sólido**

Para a aplicação de defensivos agrícolas voltados ao solo e com absorção radicular pelas plantas, o uso de um veículo sólido (ou formulações sólidas) pode apresentar algumas vantagens operacionais e ambientais bastante significativas. A mistura de alguns defensivos agrícola, como herbicidas de ação em pré-emergência das plantas daninhas, em grânulos de argila de alta densidade, com sua posterior aplicação aérea, permite que eles atravessem os restos culturais e cheguem ao solo, mesmo em sistemas agrícolas com a presença de restos vegetais na superfície, o que é uma barreira, muitas vezes, para a aplicação convencional, conforme apresentado anteriormente. Uma vez no solo e dependendo do tipo de porosidade, o grânulo pode liberar gradativa ou imediatamente todo o ingrediente ativo do defensivo agrícola, com possibilidade de aumento do período residual e eficácia dos produtos utilizados, além de reduzir o potencial de lixiviação dos produtos e risco de contaminação de lençóis freáticos.

Outra vantagem muito importante é que o uso de grânulos elimina um dos maiores problemas em aplicações de defensivos agrícolas que é a deriva, em função do tamanho e da alta densidade das partículas, desde que estas não formem pó. A aplicação aérea apresenta-se ainda competitiva em custos com a aplicação terrestre de defensivos agrícolas e com ampla vantagem em termos de capacidade operacional, permitindo também uma ótima distribuição dos grânulos durante a aplicação.

Em áreas de reflorestamento, por exemplo, a aplicação de defensivos agrícolas por pulverizadores de barra convencionais, tracionados por tratores, apresenta baixa capacidade operacional, altos níveis de deriva e, em geral, grande desuniformidade na distribuição dos defensivos agrícolas

em função da grande dificuldade de tráfego nas áreas, causada por irregularidades no terreno, devido ao uso do cultivo mínimo como sistema de preparo de solo predominante e, dessa forma, pela presença de resíduos vegetais na superfície do solo. Devido a essa dificuldade nas aplicações de defensivos, observa-se, em muitos casos, além das perdas citadas, baixa eficácia dos produtos.

Carbonari e colaboradores (2010), avaliando a eficácia desse veículo sólido para aplicação de herbicidas em pré-emergência das plantas daninhas e após o plantio do eucalipto, verificaram resultados de controle semelhantes ou superiores para a aplicação aérea da formulação granulada em relação à pulverização de calda líquida (convencional), indicando uma extensão no período do efeito do residual dos herbicidas estudados.

Também para a cultura da cana-de-açúcar esta é uma alternativa viável, permitindo a aplicação em áreas de cana crua e em áreas em que a cultura já tenha atingido um estágio de desenvolvimento que inviabilize a entrada de pulverizadores convencionais.

Atualmente, na cultura da cana-de-açúcar, um dos grandes problemas é a eliminação das plantas daninhas com uma única aplicação de herbicida em pré-emergência, a qual deve garantir que a cultura permaneça sem a presença de plantas daninhas por um período próximo de 180 dias. Em muitos casos, isso não acontece, havendo a necessidade de se executar o controle de plantas daninhas através de operação manual (aplicação de herbicidas em pós-emergência, com equipamento costal), devido ao tamanho das plantas e impossibilidade do trânsito de máquinas na área. Vale destacar que o custo dessa operação manual é bastante elevado, independente do custo do produto.

Uma possível solução para esse problema seria o fracionamento da dose do herbicida aplicado em pré-emergência garantindo sua eficácia por um período maior. Dessa forma seria aplicada uma dose inicial do herbicida e uma segunda dose antes do fechamento da cultura, garantindo que não ocorra competição entre a cultura e as plantas daninhas. Tal aplicação esbarra na dificuldade operacional de aplicação da segunda dose via calda líquida, uma vez que não existem máquinas terrestres capazes de aplicar o produto com a cultura já em estágio avançado de desenvolvimento.

A aplicação fracionada e na forma de grânulos reduz a injúria a cultura, pois não há contato com as folhas e a liberação no solo é lenta. Assim, talvez

a melhor oportunidade para o uso de grânulos corresponda à essa extensão do residual de herbicidas aplicados em pré-emergência. Essa modalidade de aplicação tem amplo potencial de uso em cana crua. Nesta, a extensão do residual é, ainda, uma ótima oportunidade para garantir o controle de espécies de difícil controle e germinação tardia como as cordas-de-violão.

Para a aplicação de fungicidas com absorção radicular, essa modalidade de aplicação também oferece vantagens. Antuniassi et al. (2008) avaliaram a aplicação aérea do fungicida flutriafol em formulação granulada para controle da ferrugem da soja em diferentes doses, isolado e seguido de aplicações convencionais complementares, e verificaram uma boa eficácia do produto aplicado nessa modalidade, além da extensão do residual do produto com a redução do número de aplicações complementares.

### **Uso de adjuvantes para redução de deriva**

Entre as características da pulverização que influenciam a deriva, podem ser relacionados os tipos de ponta de pulverização, as propriedades físicas da formulação dos defensivos agrícolas, o tamanho das gotas e outros produtos adicionados ao líquido a ser pulverizado. Mudanças nas propriedades do líquido podem influenciar tanto o processo de formação das gotas como o comportamento do contato destas com o alvo, alterando o risco potencial de deriva (Miller; Butler Ellis, 2000).

O uso de adjuvantes apresenta efeito direto sobre a ocorrência de deriva em aplicações de defensivo agrícolas. Existe o conhecimento de que alguns adjuvantes podem ter um significativo efeito sobre o tamanho das gotas em pulverizações agrícolas (Butler Ellis; Miller, 1997) e o tamanho de gota um dos fatores mais importante que influenciam a deriva.

A conversão de um líquido em gotas e o destino final dessas gotas dependem das propriedades físico-químicas das soluções empregadas (Prokop; Kejklíček, 2002). O grau de quebra das gotas está diretamente ligado à viscosidade e ao escoamento da solução. Uma revisão do efeito dos adjuvantes sobre a formação e transporte do líquido pulverizado foi apresentada por Butler Ellis e Miller (1997). Adjuvantes redutores de deriva têm sido desenvolvidos especificamente para modificar o espectro de gotas, mas muitos outros adjuvantes, usados para melhorar a dinâmica da gota sobre o alvo, também influenciam o tamanho das gotas.

Segundo Hall e Fox (1996) polímeros de poliácridamida são populares adjuvantes redutores de deriva, entretanto, alguns desses produtos possuem determinadas características que dificultam o uso e podem prejudicar a eficácia, como hidratação lenta, baixa dispersão, sensibilidade à qualidade da água e degradação sob determinadas condições. Apesar disso, os autores relatam que pesquisas indicam reduções de deriva da ordem de 70% para esse tipo de molécula. Zhu e colaboradores (1997) reafirmam existir evidências de diminuição de deriva e aumento no diâmetro das gotas pulverizadas causadas pelo uso compostos, entretanto, na maioria dos casos, a eficácia é reduzida pela recirculação da calda de aplicação no pulverizador.

Western e colaboradores (1999) obtiveram incremento no tamanho das gotas e redução na deriva detectada em túnel de vento, ao adicionarem óleo vegetal ou mineral na calda de aplicação, quando comparados aos resultados obtidos com outros adjuvantes e à água somente. As maiores reduções na deriva foram obtidas com a adição óleo vegetal à calda. Cunha e colaboradores (2003), avaliando estratégias para redução da deriva de produtos fitossanitários, concluíram que a adição de um óleo vegetal à calda altera o espectro de gotas pulverizadas, aumentando o diâmetro das gotas e diminuindo a porcentagem delas mais suscetíveis às perdas por deriva. Outro exemplo da eficácia do uso de adjuvante para redução da deriva foi observado por Velini e Carbonari (dados não publicados), no qual um adjuvante específico (antievaporante e umectante) contribuiu significativamente com a redução de deriva, melhorando a chegada do produto até o alvo desejado em até 22%.

Costa (2006) também verificou um efeito bastante significativo do uso de adjuvantes para a redução da deriva em aplicações de glyphosate e 2,4-D. O mesmo autor verificou, ainda, que os efeitos dos adjuvantes utilizados para redução de deriva são dependentes das pontas de pulverização utilizadas.

### **Aplicação de defensivos agrícolas em operação conjugada à colhedora em cana-de-açúcar**

A colheita mecanizada da cana sem queima da palha deu origem a um novo sistema de produção denominado de cana crua. A colheita tradicional com queima da palha deverá estar extinta em futuro próximo, em função de pressões ambientais e trabalhistas. O resíduo vegetal que permanece na superfície, afeta diretamente a dinâmica de ocorrência de plantas daninhas e

algumas pragas importantes para a cultura da cana-de-açúcar e a aplicação de defensivos agrícolas voltados ao solo, conforme já foi discutido.

Em muitas situações, o controle de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar deve ser mantido por longos períodos, havendo urgência na procura de soluções e/ou alternativas que permitam o uso de herbicidas de ação residual em áreas com espessas camadas de palha, minimizando as perdas por retenção e fotodegradação. Uma possível solução para se contornar esse problema é o desenvolvimento de um equipamento de aplicação de herbicidas acoplado à colhedora de cana, de modo que as operações de colheita e aplicação possam ser realizadas simultaneamente. Como a deposição da palha é feita na parte posterior da colhedora, é possível realizar a aplicação, principalmente de herbicidas, diretamente sobre o solo e cobri-lo com palha após a operação. Esse tipo de aplicação apresenta grandes vantagens, destacando-se a proteção do herbicida contra evaporação e fotodecomposição, a manutenção de níveis estáveis e mais elevados de umidade do solo e a redução da quantidade do herbicida retido pela palha, aumentando a sua disponibilidade no solo.

Carbonari (2007) verificou que o herbicida amicarbazone aplicado em operação conjunta com a colhedora, apresentou elevados níveis de controle de diversas plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar, indicando uma maior disponibilidade do herbicida no solo, principalmente na camada superficial, para essa modalidade de aplicação. Para os herbicidas tebuthiuron, metribuzim, hexazinone + diuron e imazapic, alguns trabalhos realizados simulando a condição de aplicação na colhedora, aplicando o herbicida sobre o solo e em seguida cobrindo com palha, apresentaram níveis de eficácia, em geral, iguais ou superiores aos tratamentos convencionais sobre a palha ou em solo descoberto (Negrisoli, 2005; Rossi et al., 2006; Corrêa, 2006).

## Referências bibliográficas

- ABRAF – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTOS DE FLORESTAS PLANTADAS. *Anuário estatístico*: ano base 2000. Brasília: Associação Brasileira de Produtos de Florestas Plantadas, 2010.
- ANDREA; M. M.; LUCHINI, L. C. Comportamento de pesticidas em solos brasileiros: a experiência do Instituto Biológico/SP. *Boletim. Informativo SBCE*. v.27, n.2, p.22-24, 2002.

- ANP. *Boletim mensal de biodiesel*: agosto de 2011. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=57992&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebuster=1317826385041>>. Acesso em: set. 2011.
- ANTUNIASSI, U. R. et al. Aplicação aérea de flutriafol em grânulos para o controle da ferrugem asiática da soja. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO DE AGROTÓXICOS, 4. *Anais...* Ribeirão Preto, 2008.
- ANTUNIASSI, U. R. et al. *Relatórios de pesquisa Fepaf, 2009* (não publicado).
- ANTUNIASSI, U. R., BAIO, F. H. R., BIZARI, I. R. Sistema de suporte a decisão para seleção de pontas de pulverização em sistemas de aplicação de defensivos In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROINFORMÁTICA, 5. *Agronegócio, Tecnologia e Inovação*. Londrina (PR): SBI-Agro, 2005, v.1, p.1-2.
- ASAE. American Society of Agricultural Engineering. S572: Spray nozzle classification by droplet spectra. In: *ASAE Standard, AUG99*. St. Joseph: [s.n.], 2000. p.389-91.
- BRIGGS, G. G. Theoretical and experimental relationship between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Washington, v.29, p.1050-9, 1981.
- BUTLER ELLIS, M. C., MILLER, P. C. H. The effect of some adjuvants on sprays produced by agricultural flat fan nozzles. *Crop Protection*, v.16, n.1, p.609-15, 1997.
- CALDERBANK, A. The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, New York, v.108, p.71-103, 1989.
- CARBONARI, C. A. *Eficácia do herbicida amicarbazone em aplicação conjunta com a colheita de cana-de-açúcar no controle das principais plantas daninhas da cultura*. Botucatu, 2007. 119fls. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- CARBONARI, C. A. *Efeito da palha na disponibilidade do herbicida amicarbazone na solução do solo em áreas cultivadas com cana-de-açúcar*. Botucatu, 2009. 106fls. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- CARBONARI, C. A. et al. Eficácia da utilização de grânulos de argila como veículo para a aplicação aérea de sulfentrazone e isoxaflutole em área de implantação de eucalipto. *Planta daninha*, v.28, n.1, p.207-12, 2010.
- CARBONARI, C. A.; VELINI, E. D.; BOSCHIERO, M.; VALERIO, W. Avaliação da deriva em aplicações de herbicidas em cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA DE APLICAÇÃO DE HERBICIDAS, 5. *Anais...* Cuiabá: Fepaf, 2011.
- CARTER, A. D. Herbicide movement in soils: principles, pathways and processes. *Weed Research*, v.40, n.1, p.113-22, 2000.
- CHRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L. *Dinâmica dos herbicidas aplicados ao solo na cultura da cana-de-açúcar*. Piracicaba, São Paulo: [s.n.], 2005.

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. *Acompanha-mento da safra brasileira: cana-de-açúcar safra 2010/11*. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_01\\_06\\_09\\_14\\_50\\_bole-tim\\_cana\\_3o\\_lev\\_safra\\_2010\\_2011..pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_09_14_50_bole-tim_cana_3o_lev_safra_2010_2011..pdf)>. Acesso em: abr. 2011.
- CORRÊA, M. R. *Dinâmica e eficácia da mistura formulada de diuron e hexazinane no sistema de produção de cana crua*. 150fls. Botucatu, 2006. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- COSTA, A. G. F. *Determinação da deriva da mistura 2,4-d e glyphosate com diferen-tes pontas de pulverização e adjuvantes*. Botucatu, 2006. 94fls. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- COSTA, A. G. F. et al. Efeito da intensidade do vento, da pressão e de pontas de pul-verização na deriva de aplicações de herbicidas em pré-emergência. *Planta Dani-nha*, v.25, n.1, p.203-210, 2007.
- COURSHEE, R. J. Application and use of foliar fungicides. In: TORGESON, D. C. (Ed.) *Fungicide: an advanced treatise*. New York: Academic Press, 1967. p.239-86.
- CUNHA, J. P. A. R. et al. Avaliação de estratégias para redução da deriva de agrotóxi-cos em pulverizações hidráulicas. *Planta Daninha*, v.21, n.2, p.325-32, 2003.
- CZAPAR, G. F.; KANVAR, R. S.; FAWCETT, R. Herbicide and trace movement to field drainage tiles under simulated rainfall conditions. *Soil and Tillage Research*, v.30, p.19-32, 1994
- DURIGAN, J. C. Comportamento de herbicidas no ambiente. In: SEMINÁRIO TÉCNICO SOBRE PLANTAS DANINHAS E O USO DE HERBICIDAS EM REFLORESTAMENTO, 1989, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: SBS/Ab-racave/SIF, 1989.
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. *Balanco energético nacional 2010: ano base 2009*. EPE: Rio de Janeiro, 2010.
- FIRMINO, L. E. et al. Sorção do imazapyr em solos com diferentes texturas. *Planta Daninha*, v.26, n.2, p.395-402, 2008.
- FRIEDRICH, T. Quality in pesticide application technology. In: RAETANO, C. G.; ANTUNIASSI, U. R. *Qualidade em tecnologia de aplicação*. Botucatu: Fepaf, 2004. p.93-109.
- FUHR, F. Non-extractable pesticides residues in soil. In: GREENHALG, R.; RO-BERTS, T. R. *Pesticide Science and Biotechnology*. Oxford: International Union of Pure and Applied Chemistry, 1987. p.381-389.
- GAYNOR, J. D.; MACTAVISH, D. C.; FINDLAY, W. I. Surface and subsurface transport of atrazine and alachlor from a Brookston clay loam under continuous corn production. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, v.23, p.240-5, 1992.
- GELBER, L.; SPADOTTO, C.A. Comportamento ambiental dos herbicidas. In: VARGAS, L., ROMAN, E. S (Eds). *Manual de manejo e controle de plantas dani-nhas*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p.57-87.



- HAGER, A.; NORDBY, D. Herbicide persistence and how to test for residues in soils. In: BISSONNETTE, S. *Illinois agricultural pest management handbook*. Illinois: University of Illinois, 2004. p. 323-6.
- HALL, F. R.; FOX, R. D. The reduction of pesticide drift. In: FOY, C. L.; PRITCHARD, D. W. *Pesticide formulation and adjuvant technology*. [s.l.]: CRC Press, 1996. p. 209-239.
- HARTZLER, B. *Absorption of Soil-Applied Herbicides*. Disponível em: <<http://www.weeds.iastate.edu/mgmt/2002/soilabsorption.htm>>. Acesso em: jul. 2009.
- KUCKUK, R.; HILL, W.; NOLTE, J.; DAVIES, A. N. Preliminary investigations into the interactions of herbicides with aqueous humic substances. *Pesticide Science*, v.51, p.450-4, 1997.
- LAABS, V. et al. Pesticides in surface water, sediment and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brasil. *Journal of Environmental Quality*, v.31, p.1636-48, 2002.
- LEVANON, D.; CODLING, E. E.; MEISSINGER, J. J.; STARR, J. L. Mobility of agrochemicals through soil from two tillage systems. *Journal of Environmental Quality*, v.22, p.155-61, 1993.
- LI, H. et al. Sorption and desorption of pesticides by clay minerals and humic acid-clay complexes. *Soil Science Society of America Journal*, v.67, p.122-31, 2003.
- LEE, D.; FARMER, W. J. Dissolved organic matter interaction with napropamide and four other nonionic pesticides. *Journal of Environmental Quality*, v.18, p.468-74, 1989.
- LERCH, R. N.; BLANCHARD, P. E. Watershed vulnerability to herbicide transport in northern Missouri and southern Iowa streams. *Environmental Science and Technology*, v.37, p.5518-27, 2003.
- LOCKE, M. A.; BRYSON, C. T. Herbicide-soil interactions in reduced tillage and plant residue management systems. *Weed Science*, Champaign, v.45, n.2, p.307-20, 1997.
- MATTHEWS, G. A. *Application of Pesticides to Crops*. London: Imperial College Press, 1999.
- MILLER, P. C. H. Spray drift and its measurement. In: MATTHEWS, G. A.; HISLOP, E. C. *Application technology for crop protection*. [s.l.]: CAB International, 1993. p.101-22.
- MILLER, P. C. H.; BUTLER ELLIS, M. C. Effects of formulation on spray nozzle performance for applications from ground-based boom sprayers. *Crop Prot.*, v.19, p.609-15, 2000.
- MONACO, T. J.; WELLER, C. S.; ASHTON, F. M. *Weed science: principles and practices*. New York: Wiley, 2002.
- NATION, H. J. *Boom desing and sprayer use*. [S.l.]: N.I.A.E., Spraying Department, 1977.
- NEGRISOLI, E. *Associação do herbicida tebuthiuron com a cobertura de palha no controle de plantas daninhas no sistema de cana-crua*. Botucatu, 2005. 99fls. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

- OLIVEIRA, M. F. Comportamento de herbicidas no ambiente. In: OLIVEIRA JR., R. S.; CONSTANTIN, J. *Plantas daninhas e seu manejo*. Guaíba: Agropecuária, 2001. p.315-62.
- OZKAN, H. E. *Reducing Spray Drift (Bulletin 816-00)*. Ohio State University, 2000. Disponível em: < <http://ohioline.osu.edu/b816/>>. Acesso em: 22 de maio de 2011.
- PENCKOWSKI, L. H.; PODOLAN, M. J.; LÓPEZOVEJERO, R. F. Influência das condições climáticas no momento da aplicação de herbicidas pós-emergentes sobre a eficácia de controle de nabiça (*Raphanus raphanistrum*) na cultura do trigo. *Planta Daninha*, v.21, n.3, p.435-42, 2003.
- PATTY, L.; REAL, B. E.; GRILL, J. J. The use of grassed buffer strips to remove pesticides, nitrates and soluble phosphorus compounds from runoff water. *Pesticide Science*, v.49, p.243-51, 1997.
- PORSKAMP, H. A. J., VAN ZUYDAM, R. P. Spray booms must not sway. *Landbouw Mechan*, v.43, n.8, p.16-7, 1992.
- PRATA, F., LAVORENTI, A. Comportamento de herbicidas no solo: influência da matéria orgânica. *Revista Biociências*, v.6, n.2, p.17-22, 2000.
- PROCÓPIO, S. O. et al. *Manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- PROKOP, M.; KEJKLÍCEK, R. Effect of adjuvants on spray droplet size of water. *Res. Agric. Eng.*, v.48, n.4, p.144-8, 2002.
- REGITANO, J. B. et al. Imazaquin mobility in tropical soils in relation to soil moisture and rainfall timing. *Weed Research*, v.42, p.271-9, 2002.
- ROSSI, C. V. S.; ALVES, P. L. C. A.; MARQUES JUNIOR, J. Mobilidade do sulfentrazone em Latossolo Vermelho e em Chernossolo. *Planta Daninha*, v.23, n.4, p.701-10, 2005.
- ROSSI, C. V. S. et al. Eficácia do isoxaflutole e metribuzin isolados ou em mistura aplicados na presença de palha em época seca no controle de *Ipomoea grandifolia*, *I. quamoclit*, *I. nil*, *Panicum maximum*, *Brachiaria decumbens* e *Euphorbia heterophylla* em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (cana crua). In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25. *Resumos...* Brasília: SBCPD, 2006. p.350.
- SCHROEDER, G. L.; COLE, D. F.; DEXTER, A. G. Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) response to simulated herbicide spray drift. *Weed Sci*, v.31, p.831-6, 1983.
- SPADOTTO, C. A. *Comportamento e Destino Ambiental de Herbicidas*. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2002. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/>>. Acesso em: mar. 2009.
- SI, Y. et al. Influence of organic amendment on the adsorption and leaching of ethamet-sulfuron-methyl in acidic soils in China. *Geoderma*, v.130, n.1, p.66-76, 2006.
- SOUTHWICK, L. M. et al. Potential influence of sugarcane cultivation on estuarine water quality of Louisiana's gulf coast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.15, p.4393-9, 2002.

- SOUZA, E. L.; MACEDO, I. C. *Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética*. São Paulo: Única, 2009.
- SPEELMAN, L.; JANSEN, J. W. The effect of spray-boom movement on the liquid distribution of field crop sprayers. *J. Agric. Eng. Res*, v.19, p.117-29, 1974.
- STEARMAN, G. K.; LEWIS, R. J.; TORTEROLLI, L. J.; TYLER, D. D. Herbicides reactivity of soil organic matter fractions in no-tilled and tilled cotton. *Soil Science Society of America Journal*, v.53, p1690-4, 1989.
- STEVENSON, F.J. Organic matter reactions involving herbicides in soil. *Journal of Environmental Quality*, v.1, p.333-43, 1972.
- TANABE, A. et al. Seasonal and special studies on pesticide residues in surface waters of the Shinano river in Japan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.7, p.3847-52, 2001.
- VELINI, E. D. Comportamento de herbicidas no solo. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE MANEJO DE PLANTAS DANINHAS EM HORTALIÇAS. *Resumos...* Botucatu, 1992. p.44-64.
- VIANA, R. G. et al. Características técnicas de pontas de pulverização LA-1JC e SR-1. *Planta Daninha*, v.25, n.1, p.211-8, 2007.
- VIVIAN, R. et al. Persistência e lixiviação de ametryn e trifloxysulfuron-sodium em solo cultivado com cana-de-açúcar. *Planta Daninha*, v.25, n.1, p.111-24, 2007.
- WESTERN, N. M.; HISLOP, E. C.; BIESWAL, M. Drift reduction and droplet size in sprays containing adjuvant oil emulsions. *Pesticide Science*, v.55, n.6, p.640-2, 1999.
- ZHU, H. et al. Effects of polymer composition and viscosity on droplet size of recirculated spray solutions. *Journal of Agricultural Engineering Research*, v.67, p.35-45, 1997.

# 4

## Metagenoma e a desconstrução da biomassa

*Lúcia Maria Carareto Alves,  
Viviane Schuch, Jackson A. M. de Souza,  
Eliana G. M. Lemos*

### Introdução

Atualmente, uma das preocupações mundiais são as fontes de energia a serem utilizadas nas próximas décadas, principalmente porque o petróleo, que representa 40% da energia mundial, é um combustível fóssil não renovável.

A descoberta de fontes alternativas de energia, portanto, tem despertado interesse de cientistas ao redor do planeta em virtude tanto da escassez de petróleo para as próximas décadas como também pelo aumento da preocupação a respeito da poluição do meio ambiente ocasionada pelos derivados da indústria petrolífera. Uma proposta geral é a de utilizar a energia da biomassa como meio de providenciar energia moderna para os milhões de pessoas que necessitarão dela no futuro. E uma das mais importantes aplicações do sistema de energia a partir da biomassa pode ser a fermentação para a produção de etanol.

A biomassa parece ser uma interessante fonte de energia por várias razões. A principal delas é a de que a energia gerada pela biomassa pode contribuir para o desenvolvimento, além de as fontes dessa matéria-prima serem frequentemente disponíveis e a conversão em energia, possível sem altos investimentos de capital.

Nas décadas passadas, já era consenso que a produção de etanol a partir da biomassa de plantas deveria ocorrer não somente pelo uso dos açúcares

fermentáveis, tais como o amido e a sacarose, mas também partindo das frações de lignocelulose. Isso porque nesse aspecto existe uma grande variedade de fontes de matéria-prima para a produção de etanol além da cana-de-açúcar e milho: árvores de crescimento rápido, grama, plantas inteiras, produtos colaterais da produção industrial, plantas aquáticas, lixo orgânico municipal, entre outros.

Além disso, o último levantamento da safra 2010/2011 pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) mostrou que foram produzidas no Brasil 625 milhões de toneladas de cana e, aproximadamente, 167 milhões de toneladas de bagaço. O bagaço apresenta potencial para contribuir com um aumento de cerca de 50% do etanol produzido por meio do uso da lignocelulose. Esse processo, portanto, pode aumentar significativamente a produção de etanol sem expansão de áreas cultiváveis de cana-de-açúcar. Descobertas nas novas fronteiras da pesquisa de energia da biomassa poderiam ter profundas implicações para o futuro do uso da energia de biomassa.

Os microrganismos podem exercer papel fundamental em diferentes aspectos, como na desconstrução da estrutura da biomassa ou na própria síntese de combustíveis. Desse modo, podem ser utilizados para melhorar as enzimas na despolimerização da celulose, da hemicelulose e na degradação da lignina, ou ainda em sistemas de biologia sintética diretamente na produção de combustíveis. Essas atividades podem ser realizadas por microrganismos individuais, ou consórcios microbianos, organismos íntegros e enzimas isoladas.

O solo é o maior reservatório de carbono orgânico da Terra, constituindo-se em um dos mais importantes *habitats* para microrganismos, componentes essenciais da biota terrestre. Os microrganismos exercem um importante papel na manutenção da vida na Terra, atuando na ciclagem de nutrientes e minerais, na produção de biomassa, em relações simbióticas e no controle de populações. Tal versatilidade deriva de um longo caminho evolutivo, no qual inumeráveis estratégias metabólicas foram acumuladas em diferentes condições de pressão seletiva. Essa riqueza tem sido muito explorada pela biotecnologia na busca por soluções diversas tanto na melhoria no padrão de vida humano como na qualidade ambiental. Nesse sentido, a busca por novos isolados e consórcios microbianos e mesmo abordagens no nível enzimático para a realização de diversos processos têm captado grandes esforços nas esferas acadêmica e industrial.

As rotas para produção de biocombustíveis incluem a prospecção de genes, enzimas e microrganismos. A abordagem metagenômica para prospecção de enzimas degradadoras da biomassa vegetal tem especial vantagem por se destacar como a base para encontrar genes relacionados às variadas atividades enzimáticas em sistemas biológicos até então desconhecidos. Nosso grupo já vem aplicando a abordagem metagenômica para determinação de estruturas de comunidades e análises filogenéticas. Essas análises iniciais são vistas potencialmente como formas de identificar a diversidade microbiana em solos e proporcionar um catálogo de promissoras atividades que podem ser encontradas nos diferentes solos, em virtude da comunidade neles encontrada.

Tendo como base o DNA metagenômico extraído de solos sob mata, cana-de-açúcar e eucalipto, e o gene 16S rRNA obtido desse material, bibliotecas foram confeccionadas em vetor fosmidial e plasmidial a fim de comporem um banco de clones próprio do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP). A partir desse banco, genes relacionados a síntese de xilose isomerase, amilases, celulasas e hemicelulasas de diferentes classes poderão ser obtidos com sucesso. Esses genes poderão ser utilizados em experimentos de engenharia metabólica e engenharia evolutiva, visando obtenção de linhagens capazes de realizar uma conversão mais eficiente da biomassa em etanol. Os clones contendo os genes 16S rRNA podem, também, ser utilizados para a análise da diversidade bacteriana e construção de *biochips*.

Neste capítulo, serão apresentados dados referentes à diversidade bacteriana de solos submetidos a diferentes manejos e à prospecção de enzimas microbianas importantes na degradação de biomassa. A metodologia abordada refere-se à aplicação de ferramentas de biologia molecular, microbiologia clássica e tecnologia metagenômica para o isolamento de genes de importância biotecnológica na área de produção de etanol a partir de biomassa.

## **Diversidade de microrganismos do solo e utilização dos recursos genéticos em processos biotecnológicos envolvidos na desconstrução da biomassa e produção de etanol**

Os microrganismos catalisam transformações indispensáveis dos ciclos biogeoquímicos da biosfera e produzem componentes importantes para a

atmosfera, além de representarem a maior diversidade genética e metabólica dentre as formas de vida existentes. O solo é o habitat que contém a maior quantidade e diversidade de microrganismos, um grama de solo contém mais de 10 mil diferentes espécies (Torsvik; Ovreas; Thingstad, 2002).

A utilização de técnicas de cultivo puro permite o estudo de microrganismos individualmente e sua caracterização, principalmente por critérios metabólicos (provas bioquímicas). Entretanto, a abordagem do cultivo limita seriamente a avaliação taxonômica e filogenética como estimativa da diversidade microbiana, devido à falha do cultivo da maioria dos microrganismos pelos métodos convencionais (Pace, 1997).

Microbiologistas sempre investiram grandes esforços na descoberta de microrganismos capazes de sintetizar compostos e de catalisar reações importantes, dentro da perspectiva humana. A busca por eles levou os pesquisadores a isolarem dezenas de milhares de linhagens produtoras de diversas substâncias de interesse biotecnológico e, ainda hoje, aqueles cultiváveis de solo representam, por exemplo, a principal fonte de antibióticos e outros compostos bioativos.

Atualmente, o uso de técnicas de biologia molecular permite uma análise populacional independente do cultivo, baseada no estudo do conjunto de genomas do ambiente. Análise da comunidade total de DNA de uma amostra constitui uma medida de sua heterogeneidade, inferindo-se para a diversidade microbiana nela presente. Coletivamente, o genoma da microbiota total encontrada na natureza é denominado metagenoma – termo usado pela primeira por Handelsman e colaboradores em 1998 –, sendo que tal estratégia permite o acesso de muito mais informação genética que os procedimentos baseados em cultivo. Metagenoma é o conjunto de genes de um determinado ambiente, e pode ser analisado de modo similar ao que se faz com um genoma único (Figura 4.1).

Essa abordagem envolve o uso de vetores para clonar, estavelmente, segmentos de DNA de amostras ambientais (Shizua et al., 1992). Vários vetores têm sido utilizados como sistema de expressão para estudar genomas microbianos de organismos pré-cultivados ou do DNA microbiano total extraído diretamente do solo (Figura 4.2) (Rondon et al., 2000). Essa clonagem constitui, portanto, uma ferramenta útil para o estudo do conteúdo genômico total da microbiota de uma amostra, como solo. Através

de clonagem e análise de grandes segmentos de DNA microbiano do solo ou de qualquer ambiente, pode-se avaliar com mais detalhes a diversidade, a fisiologia e a função dos microrganismos na natureza. Além disso, essas metodologias possibilitam o isolamento e expressão de genes de interesse em diversos setores da indústria biotecnológica, sem a necessidade de isolamento dos microrganismos do ambiente.

O solo constitui, indubitavelmente, um dos principais reservatórios de carbono orgânico da Terra e um dos mais importantes *habitats* para microrganismos, principalmente procariotos. A abundância do carbono e outros elementos produzidos por procarióticos sugerem que cerca de metade do protoplasma vivo da terra seja de origem microbiana (Whitman et al., 1998). Devido à vasta diversidade, às grandes populações e à longa história evolutiva, os microrganismos vêm contribuindo fortemente para a riqueza

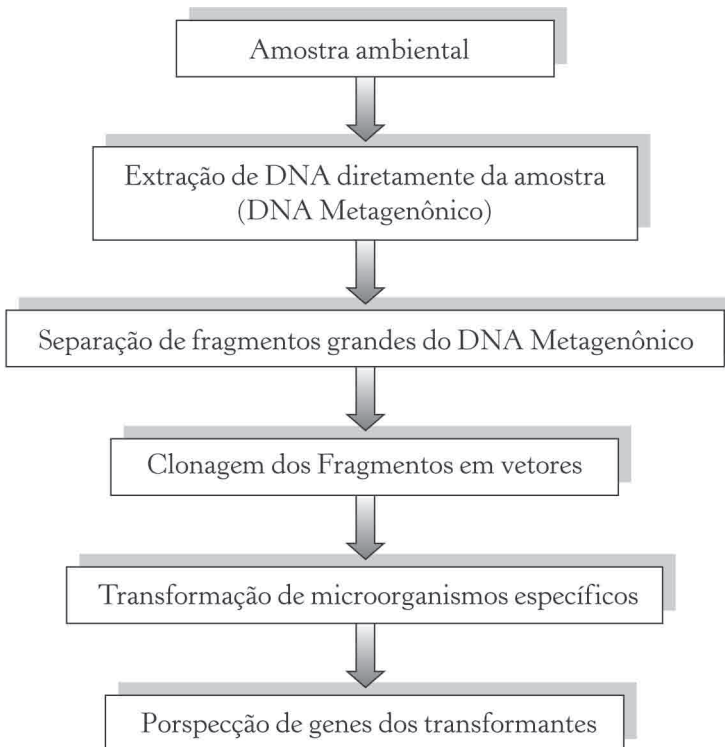


Figura 4.1 – Esquema mostrando a sequência de procedimentos para estudo do DNA metagenômico extraído da amostra de um solo



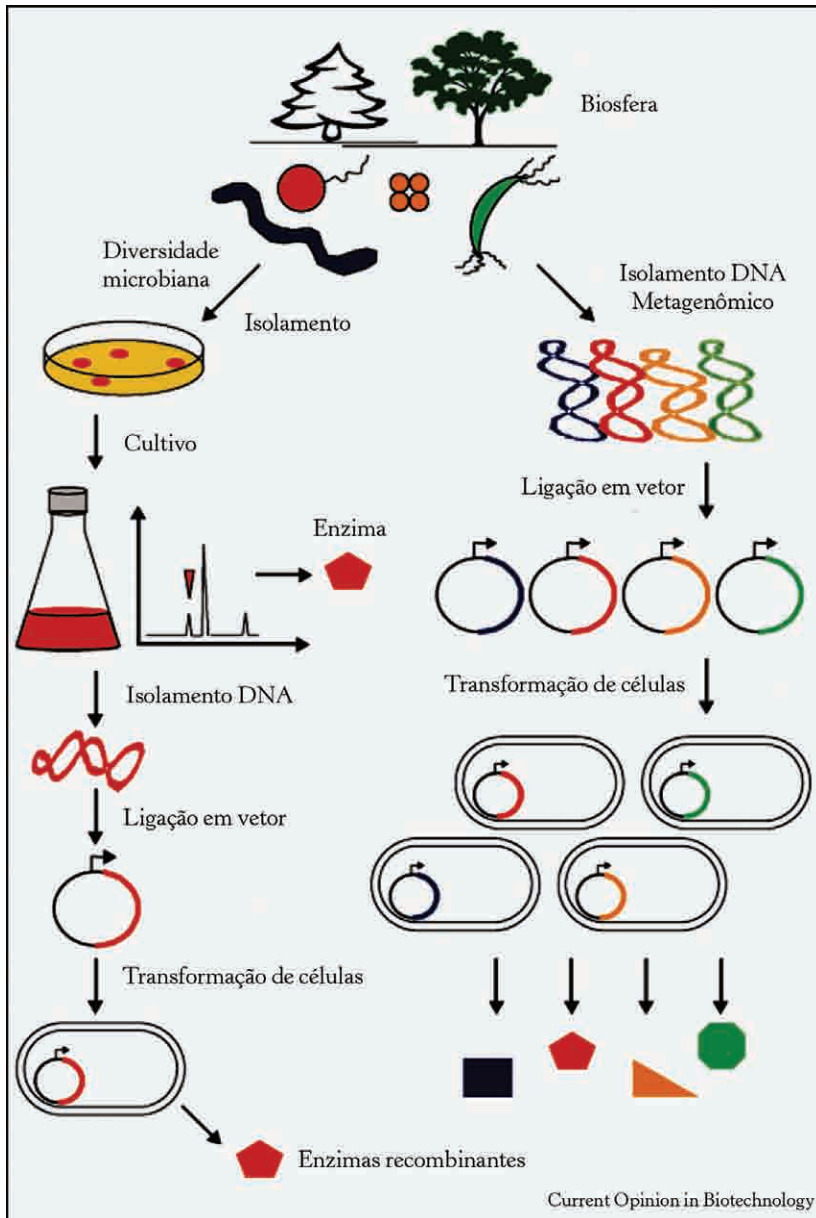


Figura 4.2 – Comparação esquemática de duas diferentes abordagens para obtenção de novas enzimas. Usando a tecnologia de cultivo a partir de isolamento de organismos (esquerda); e a partir da técnica metagenômica (direita). Pela técnica tradicional de cultura, enzimas de interesse podem ser obtidas por cultivo e extração ou clonagem de um gene específico. Pela técnica metagenômica pode-se isolar e clonar vários genes de um ambiente, para posterior prospecção e expressão de uma enzima desejada. (Lorenz et al., 2002)

za e a complexidade das interações entre os organismos do solo, incluindo desde simbioses altamente específicas a mutualismos difusos (Beare et al., 1995). Tais organismos são componentes essenciais no processo de decomposição do solo, no qual resíduos de plantas e animais são degradados em matéria orgânica, liberando nutrientes na cadeia alimentar.

O número dos microrganismos e sua biomassa coletivas varia dentro e entre os diferentes tipos e condições dos solos, sendo o grupo das bactérias mais numeroso (Whitman et al., 1998), mas o grupo dos fungos tem igual ou maior importância em muitos solos, como mostrado pela íntima associação com raízes de plantas e pela competência saprofítica com detritos fisicamente maiores e compostos estruturalmente complexos (Meeting Jr., 1993; Carrol; Wicklow, 1992). Um grau muito maior de plasticidade fenotípica e genotípica existe dentro de comunidades microbianas do que foi previamente avaliado.

Evidências demonstram que os microrganismos presentes em ambientes naturais são filogeneticamente mais diversos do que era sabido pelas análises de sequências de linhagens cultivadas (Hugenholtz; Pace, 1996). A ampla ocorrência de partículas virais infecciosas, mutações, plasmídeos e outros elementos genéticos móveis e seus papéis nos processos de transdução, transformação e conjugação permitem concluir que ecossistemas microbianos são comunidades geneticamente abertas (Terzaghi; O'Hara, 1990) e com enorme potencial de aquisição de diversidade genética (Whitman et al., 1998).

Até recentemente, com o desenvolvimento de técnicas de cultivo puro, os microrganismos puderam ser estudados isoladamente e caracterizados, em algum grau, por critérios nutricionais, principalmente. Entretanto, a abordagem do cultivo limitou seriamente a avaliação taxonômica e filogenética, como estimativa da diversidade microbiana, devido à falha de cultivo da maioria dos microrganismos pelos métodos convencionais (Pace, 1997). Nesse contexto, numerosos meios de cultura, seletivos e não-seletivos, foram utilizados para enumerar e isolar microrganismos do solo e da rizosfera com influência destes nos graus de diversidade genética obtida (Sorheim, 1989; Buyer, 1995; Tabacchioni et al., 2000). Entretanto, ferramentas moleculares e tecnologias baseadas em sequências gênicas vêm reduzindo essas limitações e revelando nova perspectiva sobre a diversidade microbiana.

A caracterização dos microrganismos *não-cultiváveis*, utilizando-se de métodos moleculares e análises filogenéticas a partir de sequências de DNA, é, portanto, um esforço para identificar e conhecer suas distribuições e funções no meio ambiente. Os novos métodos de detecção de microrganismos, sem necessariamente cultivá-los, certamente contribuirão para inferências inéditas sobre sua significância nos solos.

Ambas as abordagens, baseada em cultivo (Hattori et al., 1997) ou cultivo independente, apoiam, uma vez mais, o estabelecido de que os solos representam um dos mais diversos *habitats* para microrganismos. Estudos moleculares, tais como os resultantes das análises de sequências de 16S rRNA, confirmam a rica diversidade entre divisões bacterianas divergentes (Hugenholtz et al., 1998), por exemplo. Assim, as divisões Proteobacteria  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  são usualmente bem representadas, como são Cytophagales, Actinobacteria e Gram-positivas de baixo conteúdo de GC. Esses resultados são particularmente relevantes para a descoberta de produtos naturais, pois membros cultiváveis dessas últimas duas divisões são prolíferos produtores de antibióticos (Rheims et al., 1996).

Em relação aos fungos, estimativas sugerem que há 1,5 milhão de espécies na Terra, sendo que aproximadamente 70 mil delas foram descritas, donde se conclui que 95% encontram-se ainda sem descrição (Hawksworth et al., 1997). Estratégias utilizadas para tal identificação incluem análises comparativas de sequências de 18S rRNA (Pace, 1997; Kowalchuk, 1998). Outros exemplos poderiam ser citados sobre o impacto dos estudos cultivo independentes no conhecimento da filogenia e diversidade microbiana no solo; e, quão pobremente estão representados pelos seus membros cultivados.

A partir da década de 1980, um grande número de metodologias moleculares DNÁsicas vêm sendo desenvolvidas para análise da diversidade microbiana dos solos (Amann; Ludwig; Schleifer, 1995; Borneman; Triplett, 1997; Cullen; Hirsch, 1998; Duarte et al., 1998; Muyzer et al., 1993; Torsvik et al., 1998). Com quantidades pequenas de solo, tais procedimentos permitem análise de múltiplas amostras com eficiências próximas de 80% e purificação de DNA com o emprego de *kits*, tornando as análises mais rápidas (Zhou et al., 1996; Kuske et al., 1998; Ogram et al., 2000).

Empregando-se de reassociação cinética do DNA extraído de comunidades bacterianas, Torsvik e colaboradores (Torsvik et al., 1990a; 1990b)

encontraram números acima de 10 mil espécies em apenas um grama de solo sob floresta, muitas das quais nunca haviam sido cultivadas em laboratório. Ritz e Griffiths (1994), empregando hibridização do DNA total extraído de diferentes solos, e sob diversas condições, verificaram diferentes padrões de diversidade genética entre os mesmos. Com relação aos fungos, avaliação por métodos moleculares sugere que a grande maioria das espécies do planeta ainda está por ser revelada e analisada (Hawksworth et al., 1997; Amann; Ludwig; Schleifer, 1995).

O acesso molecular individual aos tipos de bactérias existentes no solo tem sido baseado na determinação das sequências dos genes 16S rRNA (Figura 4.3) amplificados e clonados (Borneman; Triplett, 1997; Kuske et al., 1998; Borneman et al. 1996; Lee et al., 1996; Gesolmino et al., 1999). Por outro lado, a distinção entre espécies de fungos, embora menos frequentemente utilizada, tem sido feita com base nas sequências 18S rRNA (Borneman; Triplett, 1997; Amann; Ludwig; Schleifer, 1995; Elsas et al., 2000). Outras tecnologias têm sido avaliadas e aperfeiçoadas para análise da biodiversidade do solo, tais como a técnica do T-RFLP p (Liu et al., 1997) e a de *shotgun* para sequenciamento do DNA de clones genômicos, fragmentos de restrição e produtos de PCR (Birren et al., 1997).

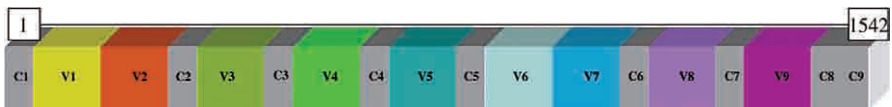


Figura 4.3 – Estrutura do genes 16SrRNA – O gene do rRNA 16S das bactérias (1542pb) consiste de nove sequências conservadas (C1-C9), espaçadas por regiões hipervariáveis (V1-V9, com 10 a 50 bases). A amplificação do gene 16SrRNA com o uso de *primers* específicos para regiões conservadas e que consigam amplificar também regiões variáveis facilitam a identificação das bactérias. (Petrosino et al., 2009)

Atualmente, as novas metodologias de sequenciamento de DNA em grande escala têm colaborado e tornado mais ágeis os estudos metagenômicos, quer seja nas análises de diversidade, quer seja na prospecção de genes. Essas novas tecnologias, além de estarem se tornando pouco onerosas, têm a capacidade de geração de uma grande quantidade de dados em um curto espaço de tempo. Dessa forma, diversas amostras ambientais estão sendo

avaliadas através do sequenciamento em grande escala: oceanos (Sogin et al., 2006; Huber et al., 2007), solos (Leininger et al., 2006; Fierer et al., 2007), recifes (Wegley et al., 2007), assim como amostras fecais e de biofilmes (Mardis, 2008; Claesson et al., 2010).

A diversidade biológica de muitos ecossistemas pode ser ameaçada por processos degradativos diversos. Relativamente pouco tem sido feito para quantificar as relações benéficas entre diversidade microbiana, funcionamento do solo-qualidade vegetal e sustentabilidade do ecossistema (Kennedy; Smith, 1995). Em agroecossistemas, as funções mais importantes são aquelas envolvidas na ciclagem de nitrogênio e carbono, na manutenção da estrutura do solo, na antibiose etc.

Relata-se que a desertificação do ecossistema terrestre atinge milhões de hectares anualmente, como resultado dos impactos das atividades degradativas antropogênicas, caracterizadas pelo aumento da atividade dos agentes naturais, ameaçando a sustentabilidade dos solos. Distúrbios nas comunidades naturais vegetais são os primeiros sintomas visíveis desse desequilíbrio; porém, frequentemente são acompanhados ou precedidos por perda das propriedades físico-químicas e biológicas, principalmente, microbiológicas dos solos (Mäder et al., 1996; Requena et al., 2001). Tais propriedades determinam, decisivamente, a fertilidade e a qualidade dos solos, alterando diretamente o estabelecimento e a produtividade das plantas.

Desde que apenas uns poucos microrganismos no solo são produtores primários, sendo em sua maioria saprófitas ou entidades mutualísticas, estes, por sua vez, dependem da produção primária das plantas; e, assim, esses dois sistemas biológicos estão fundamentalmente interligados (Ohtonen et al., 1997). O funcionamento do ecossistema do solo é, portanto, governado, em grande parte, pela dinâmica de sua população microbiana que é fortemente influenciada pelos distúrbios aplicados ao solo.

Sistemas convencionais de produção agrícola, baseados em agroquímicos, constituem fontes de poluição que, direta ou indiretamente, contribuem para a degradação do ambiente biológico do solo, com destruição dos recursos naturais (Filser et al., 1995). Da mesma forma, o cultivo intensivo baseado em práticas culturais agressivas altera a biota do solo, causando, inclusive, erosão excessiva com poluição das águas superficiais e lençóis freáticos (Filser et al., 1995; Hassink et al., 1991; Valarini et al., 1998). Des-

matamento (Cullen; Hirsch, 1998) e desertificação, em particular, apresentam impacto negativo, reduzindo o potencial de inóculo de simbiontes microbianos mutualísticos os quais constituem fatores essenciais na ciclagem dos principais nutrientes de plantas e, portanto, na sustentabilidade da cobertura vegetal em *habitats* naturais (Requena et al., 2001).

O crescimento e desenvolvimento das culturas estão estreitamente relacionados à natureza da microbiota do solo. A baixa eficiência de produção agrícola é influenciada por fatores fisiológicos culturais, pelo ambiente e por outros fatores biológicos representados, principalmente, pelos microrganismos do solo. A microbiota do solo e, particularmente, da rizosfera podem acelerar o crescimento das plantas, podendo apresentar efeito primário em ambos, qualidade do solo e qualidade do cultivo.

Manejo de associações simbióticas entre plantas e microrganismos, por exemplo, pode restaurar ecossistemas desertificados (*ibidem*). Do ponto de vista fitossanitário, as interações microbianas em alguns solos podem naturalmente prevenir o estabelecimento de patógenos ou inibir suas atividades patogênicas. Tal fenômeno é denominado supressividade do solo (Baker; Cook, 1974), sendo esta relacionada diretamente à atividade microbiana do solo (Rodríguez-Kábana; Calvet, 1994).

A metagenômica é uma abordagem promissora que, além de permitir estudos da diversidade microbiológica de um ambiente sem o isolamento desses, ainda permite acessar o genoma desses organismos incultiváveis, e oferece a oportunidade de recuperação de genes desconhecidos que estão diretamente envolvidos na biossíntese de inúmeros compostos de importância tecnológica. Essa tecnologia consiste na extração de DNA diretamente do ambiente e construção de uma biblioteca de grandes fragmentos desse genoma misto.

## **Resultados de pesquisas na área metagenômica relacionados à desconstrução da biomassa para produção de etanol**

A equipe do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Fcv) da Unesp

construiu algumas bibliotecas metagenômicas com genes 16SrRNA e bibliotecas em vetores capazes de receber grandes fragmentos de DNA. Essas bibliotecas estão sendo usadas para avaliar a diversidade em solos submetidos aos mais variados manejos agrícolas (Figura 4.4) e para a prospecção de genes de importância biotecnológica, incluindo genes envolvidos na biossíntese de compostos antioxidantes, enzimas e antibióticos. A subclonagem dos vetores selecionados, contendo os genes de interesse, permite o isolamento, sequenciamento e expressão dos genes de que poderão contribuir para a busca de bioprodutos e inovações biotecnológicas.



Figura 4.4 – Fotos dos locais de coleta de solos para análise da diversidade de microrganismos e construção de bibliotecas metagenômicas. Em sentido horário: área de solo sob arboreto de eucalipto (Unesp); solo cultivado com hortaliças e tomate; área de solo sob floresta nativa (Unesp); solo cultivado (milho, feijão, soja)

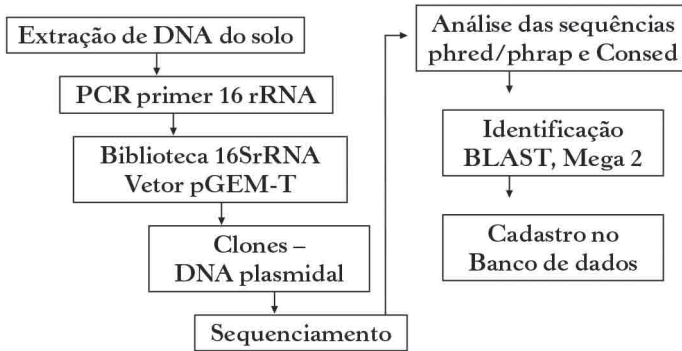
Os estudos dos microrganismos dos solos por análise metagenômica realizados pelo grupo de Pesquisa de Bioquímica de Microrganismos e Plantas da Fcav/Unesp revelaram a diversidade bacteriana de solos de florestas nativas ou solos submetidos a diversas manipulações, como o cultivo intenso de milho e hortaliças, áreas de pastagens e áreas sob eucalipto, além do tratamento com lodo de esgoto. Nesses estudos, puderam ser observadas

diferenças nas populações bacterianas e, fundamentalmente, o desaparecimento de determinados grupos conforme a manipulação sofrida pelos solos:

- Silveira, E. L.; Pereira, R. M.; Scaquitto, D. S.; Pedrinho, E. A. N.; Moraes, S. P. V.; Wickert, E.; Carareto Alves, L. M.; Lemos, E. G. M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. *PAB*. v.41, p.1507-1516, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v41n10/a08v4110.pdf>>;
- Pereira, R. M.; Silveira, E. L.; Scaquito, D.C.; Pedrinho, E. A. N.; Moraes, S. P. V.; Wickert, E.; Carareto Alves, L. M.; Lemos, E. G. M. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. *Braz. J. Microbiol.* v.37, p.439-447, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v37n4/v37n4a07.pdf>>;
- Pereira, R. M.; Silveira, E. L. da; Carareto Alves, L. M.; Lemos, E. G. de M. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. v.32, p.1921-1927, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v32n5/13.pdf>>;
- Pedrinho, E. A. N.; Lemos, E. G. M.; Pereira, R. M.; Silveira, E. L.; Carareto Alves, L. M.; Wickert, E.; Valarini, M. J. Avaliação do impacto do lodo de esgoto na microbiota do solo utilizando o gene 16S rRNA. *Arq. Inst. Biol.* (Impresso). v.76, p.443-448, 2009. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76\\_3/pedrinho.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v76_3/pedrinho.pdf)>;
- Val-Moraes, S. P.; Valarini, M. J.; Ghini, R.; Lemos, E. G. M.; Carareto Alves, L. M. Diversidade de bactérias do solo sob vegetação nativa e cultivo de hortaliças. *Cienc. Agron.* (UFC. Impresso). v.40, p.7-16, 2009. Disponível em: <<http://www.ccarevista.ufc.br/seer/index.php/ccarevista/article/viewFile/397/293>>;
- Val-Moraes, S. P.; Marcondes, J.; Carareto Alves, L. M.; Lemos, E. G. M. Impact of sewage sludge on the soil bacterial communities by DNA microarray analysis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. p.DOI: 10.1007/s, 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/d666852488r35335/fulltext.pdf>>.

Nesses trabalhos, a metodologia básica utilizada consistiu em se isolar o DNA metagenômico, fazer uma reação de PCR com essas amostras metagenômicas, clonar os fragmentos obtidos, sequenciar e comparar os resultados com o banco de dados, segundo o esquema a seguir.





O DNA metagenômico extraído de diferentes solos apresentou fragmentos com alto tamanho molecular (Figura 4.5A), o que pode ser conseguido através da utilização de *kits* comerciais específicos. Esse material foi, então, submetido à reação de amplificação com oligonucleotídeos específicos para o gene 16SrRNA (Kuske et al., 1997) gerando, assim, um conjunto de fragmento com 1500pb (Figura 4.5B). Os fragmentos da PCR foram inseridos em vetor plasmídico, clonados em *Escherichia coli*, sendo as células transformadas selecionados em meio de cultivo contendo IPTG e X-Gal (Figura 4.5C). A inserção do fragmento de DNA dá-se na região do gene *lacZ* responsável pela síntese de  $\beta$ -galactosidase que quebra o substrato X-gal, originando coloração azul. Por essa metodologia as células que receberam o inserto formam colônias brancas uma vez que não são mais capazes de sintetizar a  $\beta$ -galactosidase, e as que não receberam formam colônias azuis.

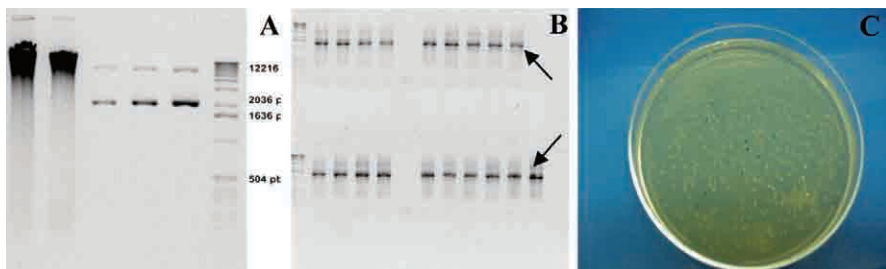


Figura 4.5 – Resultados da metodologia aplicada para análise da diversidade de microrganismos por abordagem metagenômica. A) eletroforese de DNA metagenômico; B) eletroforese do produto de amplificação do DNA metagenômico com oligonucleotídeos específicos para o gene 16S rRNA; C) placas contendo clones transformados com plasmídeos contendo amplicons do gene 16Sr RNA.

Os clones obtidos puderam ser utilizados para a análise da diversidade das amostras ambientais através do sequenciamento dos fragmentos clonados e da técnica de microarranjo de DNA. Demonstrando, assim, que a diversidade bacteriana dos solos submetidos a diferentes tratamentos pode ser alterada, alguns microrganismos desaparecem e outros aumentam sua população. Em diversas situações essa alteração populacional pode significar perda de elementos importantes de um ambiente ou aparecimento de organismos de modo desequilibrado.

Um aspecto que está sendo estudado atualmente, e também com as ferramentas da metagenômica, é a avaliação da interferência da cana de açúcar na microbiota dos solos. Assim, essa abordagem foi aplicada para um estudo da diversidade através da clonagem e do sequenciamento de fragmentos 16S rDNA de dois sistemas de solo no estado de São Paulo: 1) mata nativa e 2) cultura da cana. Fragmentos 16S rDNA foram amplificados e clonados em vetor pGEM-T *easy*, permitindo o posterior sequenciamento de DNA e análise da comunidade do grupo Bacteria.

As sequências FASTA obtidas foram analisadas e comparadas com o GenBank do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), e análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa Bionumerics (6.0.1 – AppliedMaths) baseados em sequências alinhadas. Os dados revelaram que, em comunidades do solo da floresta eram predominantes *Acidobacterium*, *Verrucomicrobium*, *Proteobacterium*, *Firmicutes*, *Actinobacterium*, enquanto no solo das culturas de cana foram encontrados *Firmicutes* e *Proteobacterium*.

O uso de ferramenta da metagenômica é um avanço real para compreender a função e como interagem os membros de uma comunidade microbiana complexa, assim como isolar genes de interesse biotecnológico (Streit; Schmitz, 2004; Handelsman, 2004). As análises metagenômicas, além de possibilitarem a observação dos microrganismos de um habitat que ainda não se consegue cultivar, possibilitam a obtenção de clones com genes codificadores das mais diversas substâncias encontradas na natureza.

A metodologia de construção de bibliotecas genômicas, que envolve a geração e clonagem de fragmentos de DNA de alto tamanho molecular em vetores apropriados, e a prospecção de genes de interesse, tem sido utilizada exaustivamente por mais de três décadas. A clonagem de DNA metagenômico, entretanto, foi pela primeira vez reportada na metade da década de

1990, com a construção de uma biblioteca de metagenoma marinho (Stein et al., 1996).

Nos últimos anos, observou-se um progresso significativo na metagenômica, que começa a proporcionar um entendimento substancial das funções da comunidade microbiana natural (Ward, 2006), assim como uma utilização biotecnológica para seus resultados. Visto que a ampla diversidade microbiana do solo e de várias comunidades constitui-se de um enorme *pool* genético e biológico que pode ser explorado para a descoberta de novos genes, vias metabólicas inteiras e seus produtos (Cowan et al., 2005).

Várias abordagens do uso de técnicas moleculares têm sido realizadas para a utilização de genes e organismos transformados para a utilização da biomassa como fonte de energia. Uma abordagem metagenômica a partir de DNA metagenômico dos microrganismos de rúmeme de bovinos identificou mais de 20 mil genes com características de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e 90 proteínas, sendo 57% delas ativas contra substratos celulolíticos (Hess et al., 2011)

A metagenômica tem sido utilizada com sucesso em todas as escalas: para análises filogenéticas, para o estudo de genes (Streit; Schmitz, 2004; Voget et al., 2003; Ferrer et al., 2005), vias biossintéticas complexas (Brady et al., 2001; Gillespie et al., 2002; Courtois et al., 2003; Lim et al., 2003) para a descrição do metabolismo de bactérias desconhecidas (Tyson et al., 2004) e para estudo de comunidades microbianas contidas em diversas amostras específicas como biofilmes e consórcio de bactérias contidas em culturas de enriquecimento (Tyson et al., 2004; Knietsch et al., 2003). Muitos ambientes são focos da metagenômica, incluindo solos (Rondon et al., 2000; Courtois et al., 2003), cavidade oral (Diaz-Torres et al., 2003), rúmeme (Ferrer et al., 2005), habitats aquáticos (Kim; Fuerst, 2006), entre outros.

Estratégias diferentes para a construção de bibliotecas metagenômicas variam conforme a intenção do estudo. Bibliotecas que contêm grandes insertos de DNA ambiental são construídas principalmente em vetores cosmídeos (Courtois et al., 2003), fosmídeos (Ginolhac et al., 2004) e BAC (Rondon et al., 2000), e permitem identificação e exploração de genes e vias biossintéticas complexas. Vetores com alto número de cópias e que aceitam insertos pequenos também são utilizados pela facilidade de obtenção de DNA plasmidial suficiente para análises baseadas em sequência (Tyson et al., 2004).

A pesquisa da biblioteca metagenômica pode ser feita de diversas formas e, tipicamente, envolve hibridização com uma sonda para o gene de interesse. O sequenciamento de todos os clones da biblioteca e posterior análise genômica ou a análise da expressão de DNA heterólogo dos clones da biblioteca são técnicas eficientes, porém muito trabalhosas.

Recentemente, formatos de microarranjos têm sido desenvolvidos e avaliados para detecção de genes e análises da comunidade microbiana em ambientes complexos. Esses estudos indicam que tecnologias baseadas em microarranjos genômicos possuem grande especificidade, sensibilidade e potencial quantitativo, tornando-se uma ferramenta paralela de alto rendimento para detecção de genes em amostras ambientais (Wu et al., 2001; Zhou, 2003).

No LBMP estão sendo pesquisados genes relacionados a diversas áreas de interesse biotecnológico através da construção de bibliotecas metagenômicas. Entre essas pesquisas pode ser citada a prospecção de genes de interesse na produção de etanol a partir da biomassa.

A enzima xilose isomerase catalisa a conversão reversível da D-xilose e D-glicose para D-xilulose e D-frutose, respectivamente. Xilose é o segundo carboidrato mais abundante na natureza, e a fermentação comercial desse composto para a produção de etanol pode representar uma alternativa de aumento da produtividade para o futuro. Nos processos industriais de fermentação, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é comumente utilizada para produção de etanol. A levedura selvagem fermenta prontamente glicose, mas não é capaz de metabolizar xilose. Apenas uma pequena parcela de bactérias, leveduras e fungos filamentosos são naturalmente capazes de fermentar xilose. Neste trabalho foi realizada a prospecção de novos genes de xilose isomerase em bibliotecas metagenômicas e em isolados de Burkholdérias através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Não foi possível recuperar genes oriundos das bibliotecas metagenômicas. Dos treze isolados de Burkholdérias testados, seis apresentaram amplificação positiva para o gene de xilose isomerase (Figura 4.6). Os genes foram completamente sequenciados e as sequências foram utilizadas em análises computacionais, que permitiram estabelecer a identidade entre as sequências e a dedução da função das proteínas baseadas em similaridades. Esses genes estão sendo utilizados em ensaios de expressão, para caracterização das novas enzimas, considerando que essas sequências representam

proteínas que formam um grupo distinto quando comparado com outras enzimas do banco de dados.

Do mesmo modo, estão sendo analisados nas bibliotecas metagenômicas genes envolvidos na degradação do amido e da celulose. Os genes envolvidos na degradação do amido estão sendo prospectados a partir de reação de PCR e os da celulose, pesquisados a partir da análise funcional dos clones, duas formas frequentes de se prospectar genes de interesse em bibliotecas metagenômicas.

Atualmente, a colheita da cana-de-açúcar sem a utilização do fogo para despalha (cana crua) vem crescendo gradualmente devido à pressão da sociedade contra as queimadas e às vantagens agrônômicas da permanência da palha no campo. Essa mudança elevou a utilização de máquinas para a realização da colheita, aumentando a quantidade de matéria verde (folhas) que chega à indústria. Esse aumento trouxe desvantagens para as usinas, uma delas é a presença do amido no caldo da cana-de-açúcar, que, em altas concentrações, pode interferir negativamente no processo de fabricação do açúcar, pois as extremidades da cana-de-açúcar, bem como as folhas, são ricas em amido.

O amido pode causar vários problemas durante o refino do açúcar, interferindo no processo de filtração e cristalização, proporcionando turbidez visível durante a dissolução do açúcar em água, além de reduzir drasticamente o rendimento. Esses problemas decorrentes da presença do amido podem fazer com que a indústria tenha prejuízos durante a produção do açúcar. Para eliminação do amido, recomenda-se a aplicação de enzimas  $\alpha$ -amilases, essas enzimas agem hidrolisando as ligações alfa1-4 (presentes entre as moléculas de glicose das cadeias de amido).

As enzimas amilases atualmente disponibilizadas no mercado são comercializadas por um custo elevado e, portanto, precisam ser utilizadas de forma bem controlada. Desse modo, o desenvolvimento de novos processos de produção da amilase pode levar tanto à diminuição dos custos como à obtenção de produtos com características especiais importantes para o uso em grande escala.

Considerando-se essa abordagem, a obtenção de genes envolvidos na síntese de enzimas degradadoras de amido é de grande importância biotecnológica na atualidade. No LBMP (Milena Tavares, comunicação pessoal) estão sendo prospectados genes envolvidos na degradação de amido em bibliote-

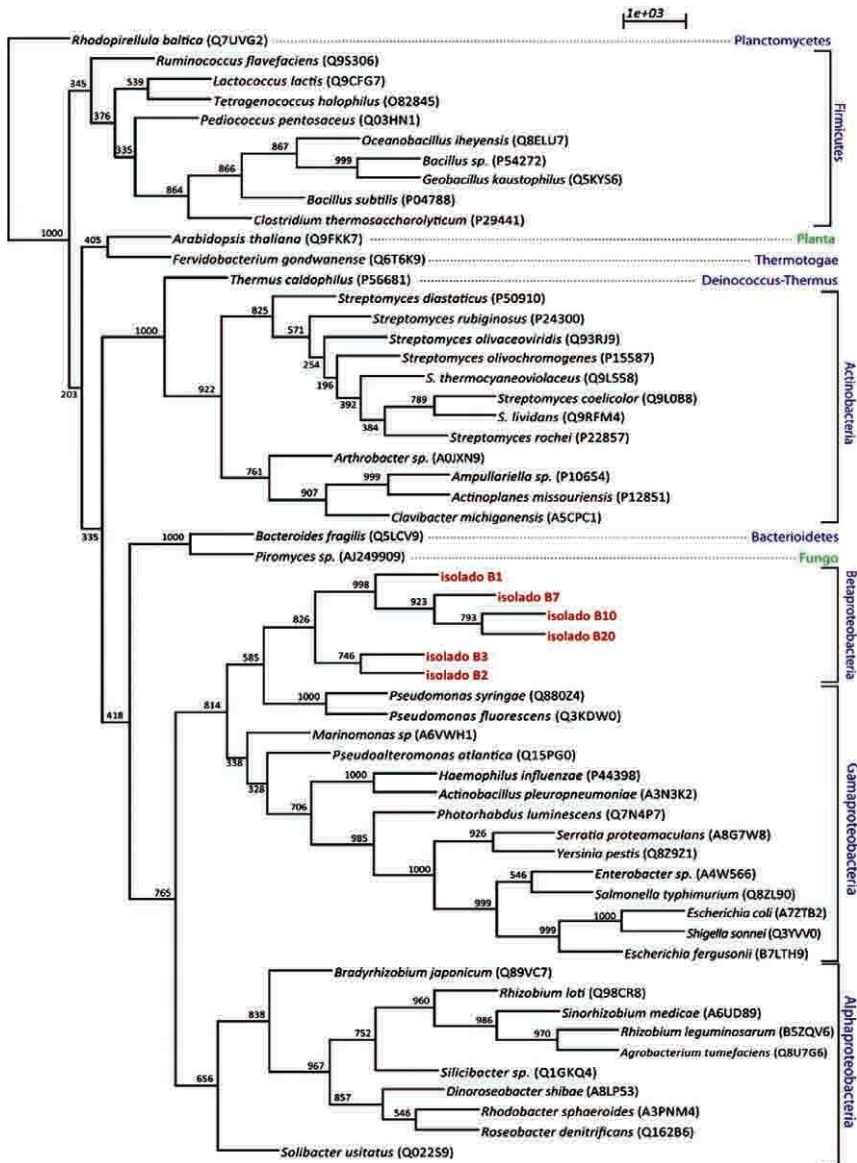


Figura 4.6 – Análise filogenética da seqüência de aminoácidos do gene de xilose isomerase. A reconstrução filogenética foi computada pelo método de distância, utilizando a matriz PAM, e o método *neighbor-joining* de construção de filogramas, com 1000 *bootstraps*. O número de substituições de aminoácidos é proporcional ao comprimento da escala. As seqüências obtidas neste trabalho estão ilustradas em vermelho. Os números de acesso das seqüências oriundas dos bancos de dados estão em parênteses ao lado do nome das linhagens. (Viviane Schuk, comunicação pessoal)

cas metagenômicas. Na Figura 4.7, pode-se observar a presença de amplificação gênica em biblioteca metagenômica construída a partir de DNA de solo cultivado com cana-de-açúcar, esse material esta sendo sequenciado e a sequência gênica de interesse deverá ser estudada *in silico* e clonada em vetores de expressão para a avaliação de suas características enzimáticas.

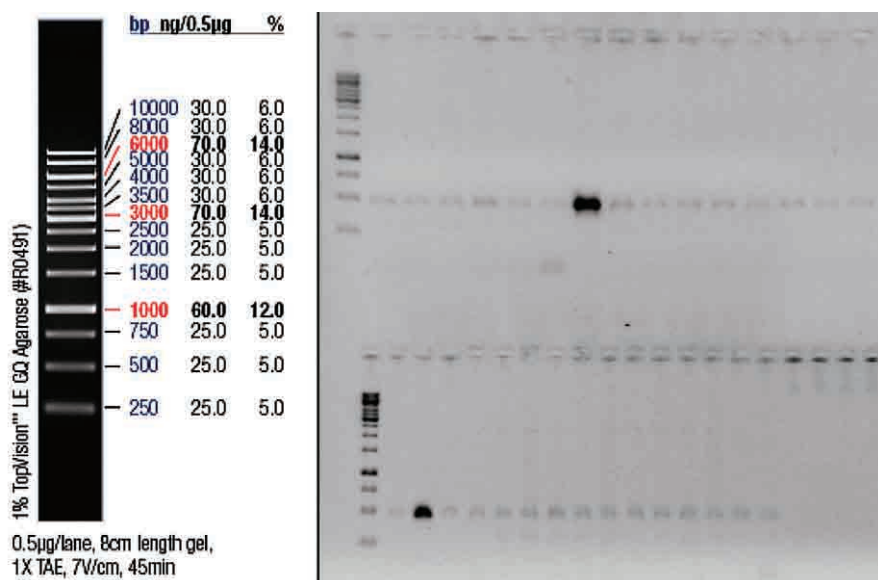


Figura 4.7 – Perfil eletroforético de uma amplificação por PCR partindo de 70 ng de DNA Fosmidial obtidos de trinta *pools* de 96 clones de fosmídeos utilizando *primers* específicos para a amilase. As amplificações intensas correspondem às placas 07 e 17.

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, uma dessas funções é a produção de enzimas extracelulares que ajudam na mineralização da matéria orgânica, liberação de carbono e nutrientes na forma em que são assimilados. Devido a esses importantes fatores, é que cada vez mais aumenta a busca por enzimas que possam ser utilizadas nos diversos setores industriais com maior aproveitamento e baixo custo.

A celulase pertence a essa classe de enzimas, ela é formada por um complexo multienzimático capaz de hidrolisar celulose através da quebra da ligação  $\beta,1-4$ . A partir disso, foi realizada uma busca de gene relacionado com a hidrólise da celulose em biblioteca metagenômica de DNA extraído

de solo de arboreto de eucalipto. Foram realizados testes bioquímicos e moleculares, partindo de um par de oligonucleotídeos iniciadores degenerados que foi construído para identificar o gene da glucanase que está ligado à hidrólise da celulose.

Com o teste bioquímico foi possível selecionar clones que estão relacionados com hidrólise da celulose (Figura 4.8), a confirmação dos clones positivos foi feita através de reações de PCR. Após a escolha do clone, foi feita uma sub-biblioteca, os clones dessa biblioteca foram sequenciados e através desse sequenciamento foi possível encontrar gene relacionado à hidrólise da celulose (Rodrigues, 2009).

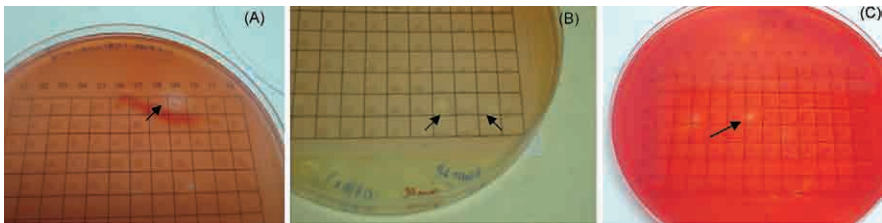


Figura 4.8 – Placas A, B e C contendo clones da biblioteca metagenômica cultivados em meio contendo vermelho congo. Resultados positivos para hidrólise da celulose puderam ser observados através da formação do halo “amarelo” ao redor dos clones que estão indicados pelas setas. (Rodrigues, 2009)

O sequenciamento dos clones da sub-biblioteca foram feitos para encontrar genes relacionados a hidrólise da celulose, as sequências foram analisadas pelo pacote phredPhrap/Consed. Foram sequenciados 864 clones dos 1.344 clones da subbiblioteca, entre os 864 clones, o inserto sequenciado possui aproximadamente 40.000pb e foram gerados 305 contigs (Rodrigues, 2009).

A anotação dos genes foi realizada de forma manual através da utilização do programa Artemis Release 10. A sequência de aminoácidos em formato FASTA foi submetida ao banco de genes do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), através do programa BLASTP, para comparação com sequências homólogas de proteínas depositadas no banco de dados. Todos os 305 contigs foram analisados e foi encontrado resultado positivo nos contigs 33, 109 e 184 (ibidem). As possíveis proteínas foram identificadas pelo programa Artemis e sua provável classificação funcional está na Tabela 4.1.



Tabela 4.1 – Relação dos possíveis genes relacionados a hidrólise da celulose.

Contigs	Função proposta de possíveis proteínas similares	Bactéria fonte da proteína similar	Similaridade/ Identidade (%)	nº de acesso proteína similar
Contig 33	cellulose synthase operon protein YhjU	Salmonella enterica subsp.	80/87	YP_02660285.1
	hypothetical protein EcolC_0178	Escherichia coli ATCC 8739	94/95	YP_001723187
Contig 109	PTS system, N,N'-diacetylchitobiose-specific IIC component	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona str. SL483	95/93	YP_02664041.1
Contig 184	PTS system, N,N'-diacetylchitobiose-specific IIC component	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Agona str. SL483	95/93	YP_02664041.1

No contig 33, observou-se similaridade da sequência com a de uma proteína do *operon* da celulose sintase. O fragmento possui 753 bases e 250 aminoácidos e não apresenta domínio conservado, mas sabe-se que dois genes são codificados e que sua função é atribuída à hidrólise de celulose insolúvel, os genes são: celulose 1,4–betacellobiosidase (*celK*) e betagluco-sidase (*bglH*).

Os contigs 109 e 184 apresentaram a formação de dois fragmentos que se complementam e formam a proteína PTS (Figura 4.9), esses fragmentos têm 705 bases e 234 aminoácidos e 679 bases e 226 aminoácidos. O sistema PTS, que é uma fosfotransferase, responsável pelo transporte e fosforilação de carboidratos, é acoplado ao PEP (fosfoenolpiruvato). Também é responsável pela “quebra” de moléculas grandes e insolúveis em água como é o caso da celulose. O sistema utiliza parte do carbono liberado pela quebra dos compostos nas ligações  $\beta$ -1,4.

O sistema PTS é bem complexo e conta com auxílio de dois conjuntos de enzimas, enzima I (EI) e HPr, e enzima II (EII) que é formada por três domínios A, B e C. Os domínios encontrados no contig 109 e 184 estão relacionados com II C, essa enzima é responsável pela proteção integral da membrana. Além disso, as sequências encontradas apresentam domínios relacionados ao sistema PRK e genes *cel B* e *cel D* (Figura 4.6). PRK é um domínio no qual o sistema PTS atua, mas nesse caso ele quebra a estrutura da quitina. Por outro lado, os genes *cel B* e *cel D* fazem parte de um operoncel,

que é composto por cinco genes *ceIA*, *ceIB*, *ceIC*, *ceID*, e *ceIF*. O gene *ceIB* codifica um produto que é requerido para o transporte e a fosforilação de celobiosefosfoenolpiruvato-dependente, e *ceID* codifica um repressor do transporte (Rodrigues, 2009).

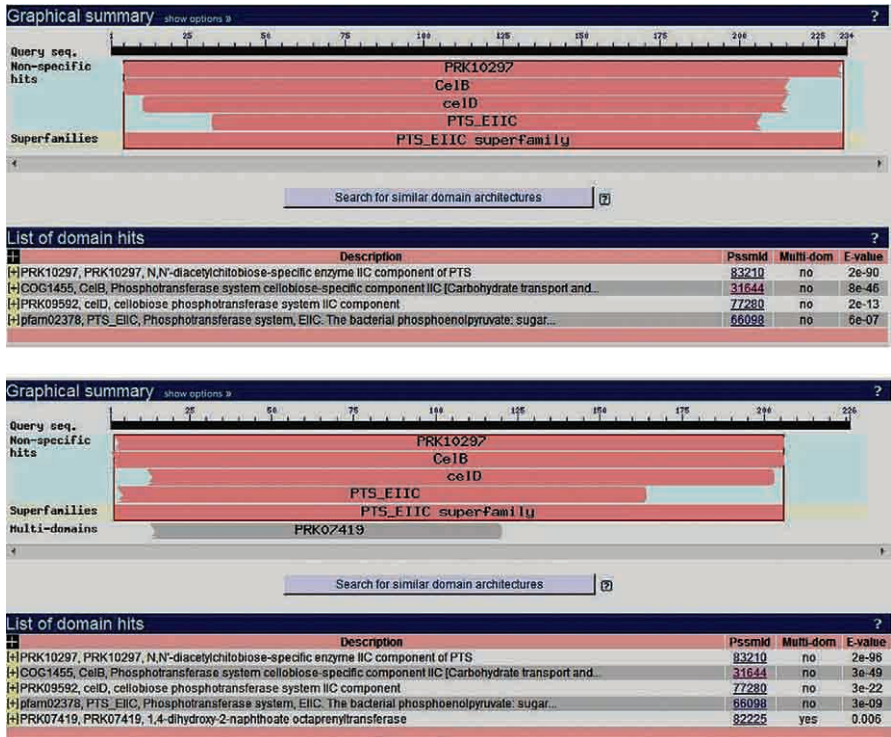


Figura 4.9 – Esquema das sequências do contig 109 após ser submetido ao BLASTP.

Outra abordagem que se pode ter através dos estudos metagenômicos é quando se inicia a pesquisa de genes a partir de uma cultura enriquecida de microrganismos. Dessa forma, está sendo realizada pesquisa de genes de interesse na desconstrução de biomassa a partir de consórcios microbianos degradadores de biomassa. Um conjunto de microrganismos (consórcio) foi isolado de solos com resíduos de cana. Esse consórcio está sendo mantido no LBMP, em meios de cultivo contendo bagaço de cana ou celulose, como fonte de carbono (Maria Luiza M. de Almeida, comunicação pessoal).

Através de análises metagenômicas os constituintes desse consórcio estão sendo estudados, assim como o DNA metagenômico dele possibilitará o isolamento de um conjunto de genes que permitirão a desconstrução da biomassa e sua utilização para a produção de etanol. Observaram-se por análises microbiológicas que esse conjunto bacteriano produz celulase e amilase (Figura 4.10), dessa forma os genes codificadores dessas enzimas deverão ser isolados e clonados em vetores de expressão para posterior estudo nos sistemas de utilização da biomassa de diferentes resíduos da agroindústria na produção de etanol.



Figura 4.10 – Bactérias de consórcio degradador de biomassa cultivadas por cinco dias em meio de cultivo BHB contendo amido (A) ou carboximetilcelulose (B) coradas com iodo (A) ou vermelho congo (B). O halo claro ao redor do consórcio revela a degradação dos dois polissacarídeos por esses microrganismos.

Através da abordagem metagenômica, pode-se vencer um grande desafio na síntese de biomoléculas por processos fermentativos, particularmente de biocombustíveis. Além da possibilidade de seleção de genes codificadores de enzimas direcionadas diretamente com a desconstrução da biomassa e disponibilização dos açúcares usados nos processos fermentativos, outros aspectos podem ser desenvolvidos. Por essa técnica, pode-se obter, por exemplo, microrganismos transgênicos resistentes às condições adversas que possam ocorrer durante o processo de produção de etanol a partir da biomassa (baixo pH, alta concentração alcoólica). Por outro lado, a biologia sintética, a partir de genes isolados do ambiente, poderá criar também microrganismos geneticamente modificados com capacidade de síntese de hidrocarbonetos mais pesados, que tenham uma maior eficiência energética e que se separem mais facilmente da água.

## Referências bibliográficas

- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, v.59, p.143-69, 1995.
- BAKER, R.; COOK, J. *Biological control of plant pathogens*. San Francisco: W.H. Freeman, 1974.
- BEARE, M. H. et al. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant soil.*, v.170, p.5-22, 1995.
- BIRREN, B et al. *Genome Analysis: Analyzing DNA, A Laboratory Manual*. 1.ed. [s.l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 1997.
- BORNEMAN et al. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, p.1935-43, 1996.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, p.2647-53, 1997.
- BRADY, S. F. et al. Cloning and heterogenous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from DNA. *Org Letter.*, v.3, p.1981-4, 2001.
- BUYER, S. A soil and rhizosphere microorganism isolation and enumeration medium that inhibits *Bacillus mycoides*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, p.1839-42, 1995.
- CARROL, G. C.; WICKLOW, D. T. *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. 2.ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1992.
- CLAESSION M. J. et al. Microbes and health sackler colloquium: composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v.108, sup.1, p.4586-91, 2010.
- COURTOIS, S. et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69, p.49-55, 2003.
- COWAN, D. et al. Metagenomic gene discovery: past, present and future. *Trends in Biotechnology*, v.23, p.321-9, 2005.
- CULLEN, D. W.; HIRSCH, P. R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol. Biochem.*, v.30, n.8/9, p.983-93, 1998.
- DIAZ-TORRES, M. L. et al. Novel Tetracycline Resistance Determinant from the Oral Metagenome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.47, p.1430-2, 2003.
- DUARTE et al. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the indigenous bacterial community. *J. Microbiol. Methods.*, v.32, p.21-9, 1998.
- ELSAS J. D. et al. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods.*, v.43, p.133-51, 2000.
- ENTCHEVA, P. et al. Direct Cloning from Enrichment Cultures, a Reliable Strategy for Isolation of Complete Operons and Genes from Microbial Consortia. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, p.89-99, 2001.

- FERRER, M. et al. Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ. Microbiol.*, v.7, p.1996-2010, 2005.
- FIERER, N. et al. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses of the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.73, p.7059-66, 2007.
- FILSER, J. et al. Effects of previous intensive agricultural management on microorganisms and the biodiversity of soil fauna. *Plant soil.*, v.170, p.123-9, 1995.
- GESOLMINO, A. et al. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods.*, v.38, p.1-15, 1999.
- GILLESPIE, D. E. et al. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.68, p.4301-6, 2002.
- GINOLHAC, A. et al. Phylogenetic Analysis of Polyketide Synthase I Domains from Soil Metagenomics Libraries Allows Selection of Promising Clones. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.70, p.5522-7, 2004.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.68, p.669-85, 2004.
- HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.*, v.5, p.245-9, 1998.
- HASSINK, J. et al. Microbial biomass and activity of a reclaimed polder soil under conventional or a reduced-input farming system. *Soil Biol. Biochem.*, v.23, p.507-13, 1991.
- HATTORI, T. et al. Advances in soil microbial ecology and the biodiversity. *Antonie van Leeuwenhoek.*, v.72, p.21-8, 1997.
- HAWKSWORTH, D. L. et al. The extent of fungal diversity: where it is to be found, and how much of it is new. *Prog. Microbial Ecol. Soc. Bras. Microbiol.*, São Paulo, Brasil, p.11-6, 1997.
- HESS, M. et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science*, v.28, p.463-7, 2011.
- HUBER, J. A. et al. Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science.*, v.318, p.97-100, 2007.
- HUGENHOLTZ, P. et al. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.*, v.180, p.4765-74, 1998.
- HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol.*, v.14, p.190-7, 1996.
- KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant Soil.*, v.170, p.75-86, 1995.
- KIM, T. K.; FUERST, J. A. Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoceratina clavata*: culture-dependent and culture-independent approaches. *Environ. Microbiol.*, v.8, p.1460-70, 2006.

- KNIETSCH, A. et al. Construction and Screening of Metagenomic Libraries Derived from Enrichment Cultures: Generation of a Gene Bank for Genes Conferring Alcohol Oxidoreductase Activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69, p.1408-16, 2003.
- KOWALCHUK, G. A. Fungal community analysis using denaturing gradient electrophoresis. In: AKKERMANS, A. D. L.; VAN ELSS, J. D.; BRUIJN, F. J. DE. *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.6. Dordrecht: Kluwer, 1998, p.1-16.
- KUSKE, C. R. et al. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection for microbial cells and spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.64, n.7, p.2463-72, 1998.
- KUSKE, C. R. et al. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, p.3614-21, 1997.
- LEE, S. Y. et al. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, p.3787-93, 1996.
- LEININGER, S. et al. Archaea predominate among ammonia oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, v.442, p.806-9, 2006.
- LIM, H. K. et al. Characterization of a Forest Soil Metagenome Clone That Confers Indirubin and Indigo Production on *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, v.71, p.7768-77, 2003.
- LIU, W-T. et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.11, p.4516-22, 1997.
- LORENZ, P. et al. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Cur. Op. Biotechnol.*, v.13, p.572-7, 2002.
- MÄDER, P.; et al. Soil ecology: the impact of organic and conventional agriculture on soil biota and its significance for soil fertility. In: PROCEEDINGS OF THE 11TH IFOAM INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE. International Federation of Organic Agriculture Movements (Ifoam), v.1, Copenhagen, Denmark, 1996, p.11-15.
- MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu. Rev. Genom. Human Genet.*, v.9, p.387-402, 2008.
- MEETING JR., F. B. Structure and physiological ecology of soil microbial communities. In: METTING JR., F. B. (ed.). *Soil microbial ecology*. Applications in agricultural and environmental management. New York: Marcel Dekker Inc., 1993. p.3-25.
- MUYZER, G. et al., Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.59, p.695-700, 1993.
- OGRAM, A. et al. Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. *Soil Biol. Biochem.*, v.32, p.1499-504, 2000.

- OHTONEN, R. et al. Ecological theories in soil biology. *Soil Biol. Biochem.*, v.29, p.1613-9, 1997.
- PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, v.276, p.734-40, 1997.
- PETROSINO, J. F. et al. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clin. Chem.*, v.55, p.856-66, 2009
- REQUENA, N. et al. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, p.495-8, 2001.
- RHEIMS, H. et al. Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the Actinomyceteline of descent in different environments and geographical locations. *Microbiol.*, v.142, p.2863-2870, 1996.
- RITZ, K.; GRIFFITHS, B. S. Potential application of a community hybridization technique for assessing changes in the population structure of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, v.8, n.26, p.963-71, 1994.
- RODRIGUES, G. *Prospecção de genes de celulase presente em biblioteca metagenômica*. Jaboticabal, 2009. 47 fls. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; CALVET, C. Capacidad del suelo para controlar enfermedades de origen edáfico. *Fitopatol. Brasil.*, v.19, p.129-38, 1994.
- RONDON, M. R. et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.2541-7, 2000.
- RONDON, M. R. et al. Toward functional genomics in bacteria: analysis of gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v.96, p.6451-5, 1999.
- SANDAA, R. A. et al. Rapid methods for fluorometric quantification of DNA in soil. *Soil Biol. Biochem.*, v.30, n.2, p.265-8, 1998.
- SHIZUA, H. et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v.89, p.8794-7, 1992.
- SOGIN, M. L. et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v.103, p.12115-20, 2006.
- SORHEIM, R.; et al. Phenotypical divergences between populations of soil bacteria isolated on different media. *Microbiol. Ecol.*, v.17, p.181-92, 1989.
- STEIN, J. L. et al. Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J. Bacteriol.*, v.178, p.591-9, 1996.
- STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.7, p.492-8, 2004.
- TABACCHIONI, S. et al. C. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microbiol. Ecol.*, v.40, p.169-76, 2000.

- TERZAGHI, E.; O'HARA, M. Microbial plasticity. The relevance to microbial ecology. *Adv. Microbiol. Ecol.*, v.11, p.431-60, 1990.
- TORSVIK, V. L. et al. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.56, p.776-81, 1990b.
- TORSVIK, V. L. et al. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.56, p.782-7, 1990a.
- TORSVIK, V. L. et al. Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environmental. *J. Biotechnol*, v.64, p.53-62, 1998.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, v.296, p.1064-6, 2002.
- TYSON, G. W. et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, v.428, p.37-43, 2004.
- VALARINI, P. J. et al. Physico-chemical and microbiological properties of soil as affected by irrigated agricultural systems. In: PROCEEDINGS OF THE 12<sup>TH</sup> IFOAM INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE. D. Folguelman and W. Lockeretz (Eds.). Mar del Plata, Argentina, 1998, p.165-70.
- VOGET, S. et al. Prospecting for Novel Biocatalysts in a Soil Metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69, p.6235-42, 2003.
- WARD, N. New directions and interactions in metagenomics research. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v.55, p.331-8, 2006.
- WEGLEY, L. et al. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environ. Microbiol.*, v.9, p.2707-19, 2007.
- WHITMAN, W. B. et al. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v.95, p.6578-83, 1998.
- WU, L. D. K. et al. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, p.5780-90, 2001.
- ZHOU, J. et al. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* v.62, p.316-22, 1996.
- ZHOU, J. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Current Opinion in Biotechnologies*, v.6, p.288-94, 2003.





## 5

# Modificações genéticas em plantas de cana-de-açúcar visando aumento de produtividade e a utilização de genes de *Bacillus thuringiensis* para o controle biológico de insetos praga

*Manoel Victor Franco Lemos,  
Janete Aparecida Desidério*

### Introdução

Os avanços da pesquisa e da tecnologia associados ao adequado emprego das metodologias moleculares deverá, em breve, resultar numa forte aceleração do ritmo de obtenção de espécies de plantas, de animais ou mesmo de microrganismos com modificações genéticas (OGMs), que os tornarão melhor adaptados às necessidades do homem moderno, podendo contribuir de uma maneira mais intensa na produtividade de insumos importantes na atualidade e ao mesmo tempo causando menos danos ao meio ambiente (Shimoda, 1998).

Curiosamente, em um estudo relatado por Cohen (2005), as nações que se encontram agora em desenvolvimento tendem a intensificar a busca por formas alternativas e mais rápidas de alcançar níveis de produtividade de suas commodities, justamente utilizando os OGMs. No caso de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), tais esforços se iniciaram, provavelmente, com a mera construção e expressão de um transgene relacionado com um fenótipo relativo a cor. Realizou-se a clonagem e a expressão do gene codificador de uma proteína especial denominada proteína verde fluorescente (GFP), típica de organismos que vivem em profundidades abissais e que, portanto, não pode ser considerado um fenótipo observável em plantas comuns de cana-de-açúcar (Elliot et al., 1998). Com essa opção,

os autores pretenderam apenas abrir caminho, indicando que tanto a cana-de-açúcar como outras plantas já exploradas nesse contexto, como a *Arabidopsis thaliana* (Haseloff et al., 1997) se apresentam como geneticamente passíveis a tais tipos de interferências em seu genoma.

Houve também um relato da tentativa de melhoria de expressão do gene de síntese de octopina (*ocs*) com um gene denominado *act1* de arroz, sobre a expressão do gene *gusA* em células eletrotransformadas de *S. officinarum* L. (González-Cabrera et al., 1998). No início de 2002, Häusler e colaboradores, em uma revisão, descreveram uma situação ainda mais intrigante que foi justamente a modificação genética de plantas  $C_3$ , como arroz, trigo, soja e batata com material genético de plantas  $C_4$ , cuja eficiência fotossintética é reconhecidamente maior, visando melhorar a taxa de fotossíntese das primeiras. Nessa publicação os autores mencionam que a sobre-expressão de algumas das enzimas comuns aos dois tipos de metabolismo (plantas  $C_3$  e plantas  $C_4$ ) e/ou estruturas celulares relacionadas com a fotossíntese nem sempre resultaram em ganhos de acúmulo de carboidratos.

## **Abordagens iniciais visando modificações genéticas utilizando ferramentas moleculares**

Seguindo nesta linha de tentativas de modificações genéticas visando o aumento da deposição de sacarose em plantas superiores, Roitsch e colaboradores (2003) descreveram vários experimentos realizados por diferentes autores, nos quais a enzima invertase extracelular foi citada como peça fundamental nos processos que ocorrem no aparelho apoplástico do floema durante o transporte de sacarose liberada neste local, interferindo, assim, na efetiva mobilização desse carboidrato. Tais autores fazem também uma relação entre a ação de enzimas tais como a invertase extracelular e os mecanismos de defesa de plantas sadias contra agentes bióticos, descritos como atuantes em tais plantas, as chamadas proteínas PR ou proteínas de defesa (Ruffner; Geissmann; Rast, 1992).

Somente quase no final da primeira década do século XXI, McCormick e colaboradores (2008) descreveram alterações nas taxas de fotossíntese realizada nas folhas com a expressão de alguns genes de cana-de-açúcar. Os autores compararam os níveis de expressão gênica por meio de análises de

microarranjos de DNA obtidos de plantas mantidas em ciclos de iluminação/obscuridade e com material colhido de plantas transferidas para a obscuridade após um período de crescimento inicial. Entre os genes envolvidos nessas análises, pode-se citar os associados com enzimas relacionadas com a fotossíntese (plantas  $C_4$ ), os ligados ao metabolismo mitocondrial e aqueles envolvidos com o transporte de carboidratos (hexoses). Em particular, há ainda menção de alteração de atividade das enzimas Rubisco (EC 4.1.139) e hexoquinase (EC 2.7.1.1).

Posteriormente, em outro trabalho do mesmo grupo (McCormick; Watt; Cramer, 2009), em que híbridos interespecíficos entre *Saccharum officinarum* L. e *Saccharum spontaneum* L. foram analisados em relação ao acúmulo de açúcares nobres no colmo, ficou clara a relação direta entre capacidade de síntese e estocagem de hexoses com a eficiência de produção desse tipo de carboidratos. Em outras palavras, os autores indicaram que parece existir um controle fisiológico do tipo *feedback* entre as taxas de assimilação/produção de sacarose à medida que mais genes da espécie mais eficiente (*S. officinarum* L.) são comparados com essa mesma medida a partir da espécie menos eficiente (*S. spontaneum* L.) no tocante ao transporte de sacarose.

Numa revisão mais recente, van Heerden e colaboradores (2010) descrevem os fatores subjacentes ao crescimento reduzido de plantas de cana-de-açúcar, o que, sem dúvida nenhuma, caracteriza-se como uma situação desfavorável, uma vez que determina menos acúmulo de biomassa e, conseqüentemente, baixa produtividade. Segundo os autores, nem sempre há uma relação direta entre a incidência de radiação solar (plantio de verão) e acúmulo de biomassa, podendo haver desvios de até 21% da produtividade esperada.

Esta perturbação foi referida como sendo o fenômeno do crescimento reduzido (FCR) e parece estar relacionada com o *timing* próprio das plantas de cana-de-açúcar entre o período de plantio e o da colheita. Nesse período, em que a intensa oferta de energia solar deveria propiciar correspondentes recordes de acúmulo de biomassa, isso não acontece devido a um descompasso entre a capacidade de geração dos açúcares nas folhas (fotossíntese) e seu transporte para outras regiões da planta, como colmo e mesmo raízes, fazendo que o crescimento e o acúmulo final de biomassa seja menor do que o esperado.

Essas situações já descritas indicaram a necessidade de buscar alternativas determinadoras de modificações genéticas que possam alterar esse quadro, procurando um ponto de equilíbrio entre a produção e o trans-

porte de carboidratos de modo que haja energia disponível para propiciar o melhor crescimento possível das plantas e, depois disso, que haja ainda bastante potencial para acúmulo de biomassa, disponível para ser processada posteriormente.

## **Melhorias genéticas na utilização da biomassa acumulada**

Sem dúvida, aumentar a capacidade de transformação da biomassa acumulada em plantas de cana-de-açúcar durante seu ciclo produtivo em etanol ou sacarose tem sido descrito na literatura como o desafio dos novos proprietários de usinas transformadoras da biomassa. Na atualidade, muitos autores têm se preocupado em encontrar alternativas metabólicas para desencadear tais transformações. O caminho mais seguro para se atingir esses objetivos tem sido a busca de enzimas que possam catalisar as transformações de maneira a aumentar o índice de utilização da biomassa produzida em campo por plantas de cana-de-açúcar. Assim é que Harrison e colaboradores (2011) indicaram como uma dos mais importantes objetivos nessa linha de ação (aumentar a eficiência de produção de etanol) melhorar a relação custo/benefício da degradação da grande quantidade de lignocelulose produzida e armazenada nos colmos de plantas de cana-de-açúcar.

Existem sistemas de consórcios bacterianos e/ou fúngicos já descritos (Wongwilaiwalin et al., 2010) como produtores das enzimas celulolíticas capazes de promover a transformação da lignocelulose a outros substratos que posteriormente são transformados em etanol ou em sacarose, porém o rendimento ainda é bastante desfavorável em termos de produtividade.

Na descrição dos resultados obtidos por Harrison e colaboradores (2011) houve o detalhamento da construção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar portando três genes com possibilidades celulolíticas de duas diferentes fontes (duas celolohidrolases I e II obtidas de fungos e uma endoglucanase bacteriana) acumulando tais enzimas em suas folhas. Esses resultados recentes se caracterizam como um dos primeiros passos no sentido de melhorar o índice de transformação da biomassa acumulada por plantas de cana-de-açúcar, vindo a possibilitar a transformação do bagaço de cana, gerado nas usinas, em etanol e/ou sacarose conforme a necessidade de mercado.

Também Siqueira e colaboradores (2011) teceram comentários sobre o mesmo assunto e acrescentaram que as células vegetais cobertas por paredes de celulose, e por isso recalcitrantes ao ataque das enzimas celulolíticas, precisam ser atingidas por substâncias que as tornem permeáveis. No caso desse trabalho, o objetivo foi atingido com tratamento com uma mistura de ácido acético e ácido clorídrico, permitindo a degradação com um coquetel de enzimas celulolíticas. Houve um aumento considerável na conversão da celulose em outros carboidratos.

Glassop e colaboradores (2007) em uma avaliação metabólica em plantas de cana-de-açúcar constataram que ao mesmo tempo em que há acúmulo de sacarose nos colmos, ocorre o aumento do espaçamento dos internós e que no material colhido dessas plantas foram identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, um conteúdo maior de metabólitos do ciclo do ácido tricarboxílico e aminoácidos, justamente nas regiões meristemáticas, onde o crescimento celular é mais intenso. Além disso, os autores detectaram que, concomitante, ao aumento da deposição de sacarose houve também acúmulo de trealose e rafinose. Nessa mesma linha de investigação, Waclawovsky e colaboradores (2010), em um trabalho de revisão reforçam a indicação da necessidade de melhorias nos mecanismos de degradação de componentes das paredes celulares das células de plantas de cana-de-açúcar, como a lignocelulose, de modo a aumentar o rendimento bioenergético da transformação dos materiais biológicos de plantas de cana-de-açúcar em etanol ou sacarose.

Em conclusões sobre a análise de transcriptoma realizada por Manners e Casu (2011), há indicações que apontam que, devido a alta complexidade do genoma de plantas de cana-de-açúcar, não se pode delinear um conjunto de genes considerados os mais importantes no tocante à deposição de carboidratos, assim como fica difícil definir quais as condições mínimas a serem atingidas em termos de programas de melhoramento genético para se atingir essas metas. Por isso propõem que será necessário num futuro não muito distante que esforços sejam criados para se proceder ao sequenciamento completo do genoma e a correspondente anotação gênica de algumas espécies do gênero *Saccharum*. Mencionam também a necessidade de se conhecer o padrão de controle metabólico exercido em plantas de cana-de-açúcar pelo mecanismo dos microRNAs em que genes podem ser silenciados em situações particulares.

## Biocontrole de pragas da cana-de-açúcar

A utilização da bactéria gram-positiva, aeróbica e formadora de esporos denominada *Bacillus thuringiensis* como alternativa ou mesmo suplemento ao controle químico de pragas de lavouras tem se intensificado nessas duas últimas décadas e, exatamente dentro desse cenário, primeiras experiências relativas à construção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar foram iniciadas.

Downing e colaboradores (2000) relataram uma dessas abordagens ao avaliar o nível de controle da praga sul-africana *Eldana saccharina* utilizando o gene *cry1Ac7* em associação com o gene codificador da quitinase (*chiA*) isolado da bactéria *Serratia marcescens*. Em seus experimentos, houve a clonagem do gene *cry* mencionado em vetores apropriados sob o controle de promotores adequados, os autores procuraram a introdução de tal gene para uma bactéria tida como endofítica de plantas de cana-de-açúcar denominada *Herbaspirillum seropedica*. Em tais condições, relataram um sucesso com bons níveis de controle de larvas da praga *E. saccharina*. No entanto, descreveram também que, quando o mesmo gene foi clonado e transferido para células de *Pseudomonas fluorescens* 14::tox, houve melhor ação de controle quando o gene *chiA* de *S. marcescens* foi associado aos bioensaios realizados. Nesse último caso, há menor necessidade de proteína Cry para atingir os níveis referidos de controle das larvas da praga mencionada devido a cooperação entre as moléculas de proteínas Cry e as da enzima quitinase.

Em trabalho posterior Rosas-Garcia e colaboradores (2004), em um avaliação levada a efeito no México, determinaram que em vários isolados da bactéria *B. thuringiensis* foi possível efetivamente controlar larvas da broca da denominada *Diatraea saccharalis* e, inclusive, conseguiram, por meio de uma abordagem utilizando anticorpos policlonais, determinar quais isolados, dentre os analisados, mostraram significativo nível de controle e eram ao mesmo tempo produtores de proteínas Cry1A, dado que reagiram com amostras do anticorpo anti-Cry1A produzido por eles. A definição de quais isolados efetivamente foram selecionados como efetivos foi baseada nos valores de  $LC_{50}$  obtidos por eles.

Nesse mesmo formato de controle, Rosas-Garcia (2006) relatou a utilização de uma formulação obtida por suspensões de esporo/cristal processadas pela metodologia *spray-dried* que determinou um controle de aproximadamente 100% das larvas em bioensaios realizados no laboratório. Quando

os ensaios foram realizados em campo, o nível de controle caiu para cerca de 84%. Em abordagem semelhante, um grupo de autores brasileiros relataram experimentos em que isolados de *B. thuringiensis* também puderam ser caracterizados como efetivos contra larvas de *D. saccharalis*. Em especial, um isolado denominado S76 se destacou por exercer um nível de controle onze vezes maior do que a linhagem padrão de *B. thuringiensis* denominada HD-1. Esses autores descreveram esse isolado como um promissor agente a ser utilizado no controle dessa praga que, segundo eles mesmos vem determinando enormes prejuízos na produtividade de plantas de cana-de-açúcar (Gitahy et al., 2007).

Mais recentemente, Silva Cícero e colaboradores (2009) descreveram a caracterização inicial de isolados da bactéria *B. thuringiensis*, no controle de uma das pragas da ordem Coleoptera, que tem sido descrita como bastante devastadora na produção de subprodutos de plantas de cana-de-açúcar. Trata-se da espécie *Sphenophorus levis* conhecida como o “bicudo da cana”. Nesse estudo, os autores descreveram a caracterização de vários isolados, utilizando ferramentas moleculares, para avaliação da ação de proteínas Cry produzidas por genes *cry3* e *cry35*. Foram avaliados cerca de 1.163 isolados e foi possível detectar um grupo de cinco isolados que, ao serem utilizados em bioensaios realizados em laboratório, determinaram um nível de mortalidade de cerca de 70%.

## **Herança da resistência proteínas Cry de *B. thuringiensis***

Antes de considerar fatos relativos à herança da resistência às ações de controle biológico de pragas, promovidas pelas proteínas Cry, faz-se necessário situar o leitor no tópico relativo à resistência das pragas agrícolas em si, que surgiu com o uso intenso dos defensivos agrícolas ou inseticidas químicos. Este é um tópico de grande impacto na discussão relativa à produtividade agrícola não só do Brasil, mas de todo o mundo (Hall; Menn, 1999).

Como uma alternativa ao problema do relato de um número cada vez maior de pragas resistentes, os biopesticidas, mais seguros do ponto de vista ambiental, foram lançados no mercado mundial e, desde então, tem recebido muita atenção quer por serem realmente uma alternativa, quer por representarem uma forma de diminuição da pressão sobre a seleção pragas cada vez



mais resistentes aos defensivos químicos. Entre os biopesticidas utilizados para o controle de pragas, como já mencionado no início deste capítulo, destaca-se a bactéria *B. thuringiensis* (Crickmore et al., 1998; Babu et al., 2003).

Pode-se dizer que a principal dificuldade em se obter plantas de cana-de-açúcar geneticamente modificadas e expressando níveis satisfatórios de proteínas Cry de modo a efetivamente desencadear um processo de controle biológico de diferentes pragas, deve-se ao fato de, nas várias tentativas de obtenção desse tipo de plantas de cana-de-açúcar resistentes aos insetos praga, não ter havido adequado processo de clonagem desses genes e, com isso, houve sempre baixos níveis de expressão dos genes *cry* que foram utilizados nesse processos de transformação. Em outras plantas, como o algodão, o arroz, a batata, o milho etc., há relatos de sucesso nessa mesma forma de abordagem genética (James, 1999; Tu et al., 2000; Bohorova et al., 2003).

Wenge colaboradores (2006) destacam em seu relato acerca de resistência de plantas de cana-de-açúcar à broca da cana. Em seus experimentos, quando os níveis de produção da proteína Cry1Ac produzida a partir de plantas de cana-de-açúcar transgênicas portadoras de um gene *cry1Ac* sintético e, portanto, satisfazendo as exigências relativas à preferência de códons típicas de plantas de cana-de-açúcar, observaram dois tipos de comportamentos que são descritos a seguir. Quando ocorreu níveis baixos de expressão desse gene sintético, digamos devido a expressão inadequada do gene sintético, houve um rápido surgimento de populações de *D. saccharalis* resistentes e com elevada taxa de sobrevivência nos bioensaios. Entretanto, quando as montagens obtidas produziam níveis adequados da proteína Cry1Ac não foram observadas larvas da broca da cana resistentes nos ensaios realizados indicando, com isso, que ocorre a seleção de insetos resistentes quando as condições de seleção não são adequadas.

Em dois relatos apresentados na literatura internacional (Wu et al., 2009a e WU et al., 2009b) há relativamente pouco tempo atrás, há a menção da utilização da proteína Cry1Ab frente a ensaios de resistência por parte de larvas de *D. saccharalis*, em que se menciona que a piramidização, ou seja o uso de mais de um tipo de genes *cry*, em plantas transgênicas, em geral, tende a retardar o surgimento de populações de insetos praga resistentes.

Na outra publicação, os autores descreveram que foram realizados cruzamentos entre cultivares de cana-de-açúcar, transgênicos ou não, envolvendo cruzamentos diretos e reversos bem com retrocruzamentos com ge-

nitores em que haviam genes de resistência à broca da cana ou não e com esse tipo de abordagem foi possível a eles detectar que a resistência de larvas de broca da cana parece ser governada por um ou poucos genes autossômicos recessivos herdados num modelo mendeliano de herança.

## Considerações finais

Em um capítulo de livro editado por Tomes, Lekssmanan e Songstad sobre o tema *biofuels*, Matsuoka e colaboradores (2011) relataram a experiência brasileira relativa à indústria do etanol, em que os primeiros esforços levados a cabo, com plantas de cana-de-açúcar transgênica, iniciaram-se no final do século passado, totalizando nove experimentos buscando obter plantas tolerantes a herbicidas (Falco et al. 2000). Esses mesmos autores comentaram em seu texto que se espera, nos próximos anos, haver a efetiva construção de um cultivar de cana-de-açúcar transgênico, que possa ser comercializado ou mesmo ofertado aos produtores de açúcar e álcool para combustível, uma vez que já existem várias iniciativas em andamento, tanto em instituições financiadas por fundos governamentais como em projetos da iniciativa privada.

## Referências bibliográficas

- BABU, R. M.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M. S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management – an overview, *Crop Protect*, v.22, p.1071-86, 2003.
- BOHOROVA, N.; FRUTOS, R.; ROYER, M.; ESTAÑOL, P.; PACHECO, M.; RASCON, Q.; MCLEAN, S.; HOESINGTON, D. Novel synthetic *Bacillus thuringiensis cryIB* gene and the cryIB-cryIAb translational fusion confer resistance to southwestern corn borer, sugarcane borer and fall armyworm in transgenic tropical maize. *Theor. Appl. Genet.*, v.103, p.817-26, 2003.
- COHEN, J. I. Poorer nations turn to publicly developed GM crops. *Nature Biotech.*, v.23, p.27-33, 2005.
- CRICKMORE, N.; ZIEGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal Crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.62, p.807-13, 1998.

- DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.2804-10, 2000.
- ELLIOT, A. R.; CAMPBELL, J. A.; BRETTELL, R. I. S.; GROF, C. P. L. *Agrobacterium* –mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. *Aust. J. Physiol.*, v. 25, p.739-43, 1998.
- FALCO, M. C.; TULLMAN NETO, A.; ULIAN, E. C. Transformation and expression. of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. *Plant Cell Rep.*, v.19, p.1188-94, 2000.
- GITAHY, P. M.; SOUZA, M. T.; MONNERAT, R. G.; ARRIGONI, E. B.; BALDANI, J. I. A brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE). *Braz. J. Microbiol.*, v.38, p.531-7, 2007.
- GLASSOP, D.; ROESSNER, U.; BACIC, A.; BONNETT, G. D. Changes in the sugarcane metabolome with stem development. Are they related to sucrose accumulation? *Plant Cell Physiol.*, v.48, p.573-84, 2007.
- GONZÁLES-CABRERA, J.; COEGO-GONZÁLES, A.; MARTINEZ-GIL A. F.; DE LA RIVA, G. A.; VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I. Optimization of transgene expression. in sugar-cane cells. *Biotech. Tech.*, v.12, p.793-6, 1998.
- HALL, F. R.; MENN, J. J. *Biopesticides*. Totowa: Humana Press, 1999.
- HASELOFF, J.; SIEMERING, K. R.; PRASHER, D. C.; HODGE, S. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.94, p.2122-7, 1997.
- HARRISON, M. D.; GEIJSKES, J.; COLEMAN, H. D.; SHAND, K.; KINKEMA, M.; PALUPE, A.; HASSAL, R.; SAINZ, M.; LLOYD, R.; MILES, S.; DALE, J. L. Accumulation of recombinant cellobiohydrolase and endoglucanase in the leaves of mature transgenic sugar cane. *Plant Biotech. J.*, v.9, p.1-13, 2011.
- HÄUSLER, R. E. HIRSCH, H. J.; KREUZALER, F.; PETERHÄNSEL, C. Over expression of C<sub>4</sub>-cycle enzymes in transgenic C<sub>3</sub> plants: a biotechnological approach to improve C<sub>3</sub>- photosynthesis. *J. Experim. Bot.*, v.53, p.591-607, 2002.
- JAMES, C. Global Status of Commercialized Transgenic Crops. *ISAAA Briefs N.12, preview.*, ISAAA, Ithaca, NY, 1999.
- MANNERS, J. M.; CASU, R. E. Transcriptome analysis and functional genomics of sugarcane. *Tropical Plant Biol.*, v.4, p.9-21, 2011.
- MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The brazilian experience of sugarcane ethanol industry. In: TOMES, D.; LAKSHMANAN, P.; SONGSTAD, D. *Biofuels – Global impact on renewable energy, production agriculture and technological advances*. New York: Springer, 2011.
- MCCORMICK, A. J.; CRAMER, M. D.; WATT, D. A. Changes in photosynthetic rates and gene expression of leaves during a source – sink perturbation in sugarcane. *Annals of Botany*, v.101, p.89-102, 2008.

- McCORMICK, A. J.; WATT, D. A.; CRAMER, M. D. Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation. *J. Experim. Bot.*, v.60, p.357-64, 2009.
- ROSAS-GARCIA, N. M.; PEREYRA-ALFÉREZ, B. NINO, K. A.; GALÁN-WONG, L. J.; MORALES, L. H. Novel toxicity of native and HD *Bacillus thuringiensis* strains to the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*, *BioControl.*, v.49, p.455-65, 2004.
- ROSAS-GARCIA, N. M. Laboratory and field tests of spray-dried and granular formulations of a *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugarcane borer. *Pest Management Sci.*, v.62, p.855-61, 2006.
- ROITSCH, T.; HOFMANN, B. M.; PROELS, R.; SINHA, A. K. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Experim. Bot.*, v.54, p.513-24, 2003.
- RUFFNER, H. P.; GEISSMANN, M.; RAST, D. M. Plant and fungal invertases in grape berries infected with botrytis-cinerea. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.*, v.40, p.181-9, 1992.
- SHIMODA, S. M. Agricultural Biotechnology: Master of the University? *AgBioForum*, v.1, p.62-8, 1998.
- SILVA CÍCERO, E. A.; FERRAUDO, A. S.; LEMOS, M. V. F. Identificação de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Sphenophorus levis*, o bicudo da cana-de-açúcar. *Bragantia*, v.68, p.817-23, 2009.
- SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W.; KOCH, G.; FERRAZ, A. Topochemical distribution of lignina and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. *Biotech. for Fuels*, v.4, p.7-9, 2011.
- TU, J. M.; ZHANG, G. A.; DATTA, K.; XU, C. G.; HE, Y. Q.; ZHANG, Q. F.; KHUSH, G. S.; DATTA, S. K. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *Nature Biotech.*, v.18, p.1101-4, 2000.
- VAN HEERDEN, P. D. R.; DONALDSON, R. A.; WATT, D. A.; SINGELS, A. Biomass accumulation in sugarcane: unraveling the factors underpinning reduced growth phenomena. *J. Experim. Bot.*, v.61, p.2877-87, 2010.
- WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotech. J.*, v.8, p.263-76, 2010.
- WENG, L.; DENG, H.; XU, J.; LI, Q.; WANG, L.; JIANG, Z.; ZHANG, H B.; LI, Q.; ZHANG, L. Regeneration of sugarcane elite breeding lines and engineering of stem borer resistance. *Pest Management Sci.*, v.62, p.178-87, 2006.
- WONGWILAIWALIN, S. RATTANACHOMSRI, U.; LAOTHANACHAREON, T.; EURWILAICHITR, L.; IGARASHI, Y.; CHAMPREDA, V. Analysis of a thermophilic lignocellulose degrading microbial consortium and multi-species lignocellulolytic enzyme system. *Enzyme and Microbial. Tech.*, v.47, p.283-90, 2010.
- WU, X.; LEONARD, B. R.; ZHU, Y. C.; ABEL, C. A.; HEAD, G. P.; HUANG, F. Susceptibility of Cry1Ab-resistant and -susceptible sugarcane borer (LEPIDOP-

TERA: Crambidae) to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Invert. Pathol.*, v.100, p.29-34, 2009

WU, X.; HUANG, F.; LEONARD, B. R.; OTTEA, J. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein in the sugarcane borer (LEPIDOPTERA; Crambidae). *J. Invert. Pathol.*, v.102, p.44-9, 2009.

# 6

## **Eucalipto adensado: manejo para florestas energéticas**

*Saulo Philipe Sebastião Guerra,  
Kléber Pereira Lanças, Éder Aparecido Garcia,  
Raffaele Spinelli*

### **Introdução**

Uma das fontes de energia renovável mais conhecida e utilizada no mundo, desde a antiguidade, é a madeira – biomassa de origem vegetal. Essa fonte de energia foi largamente empregada, dada a facilidade de acesso, baixo custo de aquisição, não necessidade de beneficiamento pré-uso e a não exploração de combustíveis fósseis.

Com o surgimento dos derivados de petróleo e do carvão mineral, a procura pela madeira, como suprimento energético, teve sua demanda reduzida. Entretanto, em função das questões ambientais, políticas e econômicas atuais, além de fenômenos climáticos inesperados, fizeram com que o uso da madeira voltasse ao cenário mundial graças a sua potencialidade de produção energética com reduzido impacto ambiental.

Diante desse novo paradigma, adicionado da crescente demanda energética mundial, surge um conceito, que está em uma fase inicial de implantação no mundo e, praticamente incipiente no Brasil, chamado de sistema florestal de curta rotação para a produção de biomassa, de forma sustentável, com fins energéticos.

Dessa forma, serão apresentados, neste capítulo, conceitos, sistemas de produção e colheita mecanizada de usos nacional e internacional e, dados técnicos que possam fomentar o debate, o desenvolvimento e o aprimoramento da silvicultura para geração de energia limpa.

## Sistema florestal de curta rotação

Em função da crescente demanda energética, surge no cenário mundial e nacional um novo conceito que é o *Sistema Florestal de Curta Rotação* para geração de energia. Esse novo sistema de produção apresenta uma relação direta na produção de matéria-prima em quantidade e qualidade superior, obtido num intervalo de tempo reduzido e a custos inferiores, quando comparados aos sistemas silviculturais convencionais.

O sistema florestal de curta rotação, no Brasil, deve ser, inicialmente, particularizado ao plantio de eucalipto com o intuito de desenvolver um crescimento natural da planta de forma mais eficiente, sendo que, a renovação do plantio e da matéria-prima se tornarão fatores de produção com altas produtividade por unidade de tempo.

Com isso, os fatores de inovação tecnológica, pesquisa e desenvolvimento são fundamentais para que os sistemas florestais de curta rotação produzam energia abundante, renovável e, ainda, que permitam o transporte a longas distâncias de forma sustentável, econômica e socialmente.

Esse tema tem-se tornado alvo de interesse das principais agências de fomento e centros de pesquisa na Europa, Estados Unidos e Austrália, tais como: Cost (UTF-8) – European Cooperation in Science and Technology; IEA – International Energy Agency; NREL – National Renewable Energy Laboratory (EUA); Federal Aebiom – European Biomass Association (Europa); Ademe – Agence de l'Environnement e de la Maitrise de l'Energie (França); VTT – Technical.

No Brasil, agências de fomento como o CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fapesp – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Finep – Financiadora de Estudos e Projetos e BNDES – Banco Nacional do Desenvolvimento, tem programas específicos para fomentar e fortalecer novas pesquisas, projetos, equipamentos e sistemas de utilização da biomassa como fonte de energia renovável.

Diante desse desafio, a pesquisa tem gerado inovações na silvicultura, nos sistemas de corte, no transporte e na trituração com soluções, equipamentos e sistemas para aumentar a eficiência da produção da matéria-prima – a madeira.

No Brasil, os mais recentes plantios baseados no sistema florestal de curta rotação vêm apresentando produtividades elevadas, atingindo números da ordem de 120 m<sup>3</sup>/hectare (45 toneladas por hectare) em ciclos de apenas um ano. Os países líderes na utilização dessa tecnologia, com mais de 10 anos de desenvolvimento e aprimoramento, conseguem atingir os índices de produtividade nacional, porém, no dobro de tempo.

Desta forma, para produzir mais madeira, com menos recursos e menores perdas, diversas investigações científicas e práticas devem ser conduzidas para determinar a rotação da cultura ideal para cada local (12, 18, 20, 24 ou 36 meses), em função do material genético desenvolvido para ciclos de curta rotação e com alta capacidade de rebrota.

Além da silvicultura, sistemas mecanizados de colheita e transporte, com colhedoras específicas para a função, são fundamentais e determinantes para garantir a viabilidade econômica dos novos sistemas florestais de curta rotação.

Portanto, produzir uma matéria prima de alta qualidade, buscando o limite produtivo máximo das florestas, com retornos financeiros significativos para as empresas envolvidas no sistema, está diretamente relacionado com novas técnicas silviculturais e eficiência das máquinas no campo.

## **Energia originada de biomassa florestal**

Desde a revolução industrial, a necessidade incessante por fontes de energia é um tema de discussões por todo o mundo. Com o domínio da tecnologia de se utilizar os combustíveis fósseis como fonte de energia, a capacidade produtiva mundial foi ampliada, gradativamente, até os dias atuais. A grande dependência de fontes energéticas provenientes do petróleo é considerada, em vários países, um dos maiores problemas, sendo que muitos deles não têm disponibilidade ou capacidade de exploração do combustível fóssil.

A década de 1970 ficou marcada pela primeira crise do petróleo e, para Smith (1989), o conseqüente aumento do custo desse produto influenciou o setor florestal, visto que, acelerou a necessidade de substituição do petróleo por fontes alternativas de energia. Assim, os plantios florestais, com finalidade energética, tornaram-se uma fonte alternativa para a substituição do petróleo e seus derivados.



Em termos de geração de energia, a Gráfico 6.1 apresenta o volume de madeira consumido no Brasil, sendo da ordem de 100 milhões de metros cúbicos anuais a madeira destinada para fins energéticos no país (MME, 2007).

A energia consumida no Brasil, originada de biomassa, é principalmente, direcionada ao setor de transformação, através da produção de carvão vegetal para abastecer as siderúrgicas, sendo o Brasil um dos maiores produtores e consumidores de carvão vegetal do mundo. Em 2005, a produção nacional desse produto foi de 5,5 milhões de toneladas e, desse total, 2,5 milhões de toneladas (46%) foram oriundos de florestas plantadas, sendo Minas Gerais o principal estado produtor, com 1,74 milhões de toneladas (IBGE, 2007) e, nesse mesmo ano, foram consumidos 38,05 milhões de metros cúbicos de carvão vegetal. Segundo MME (2007), o setor de transformação é seguido pelos setores residencial, agropecuário e outros usos (Gráfico 6.2).

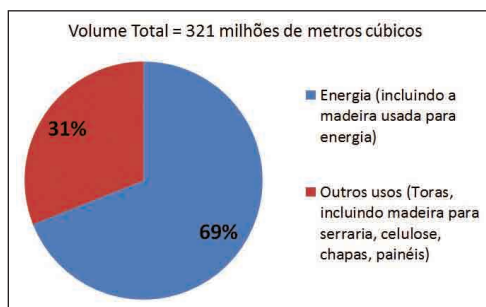


Gráfico 6.1 – Madeira consumida no Brasil (Brito, 2007).

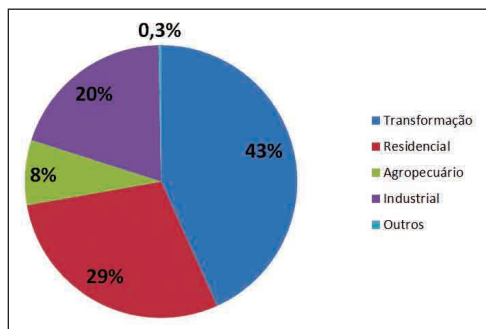


Gráfico 6.2 – Utilização energética da madeira no Brasil (MME, 2007)

Para Brito (2007), a experiência da siderurgia brasileira em carvão vegetal serve de exemplo para que, se as formas renováveis de energia, em larga escala, se tornarem viáveis, evoluirão de uma situação tecnológica primitiva e rudimentar - baseada na simples destruição das florestas – para a incorporação de tecnologias florestais mais avançadas, de forma a assegurar maior eficiência e tornarem-se ecológica e economicamente compatíveis.

## O eucalipto

De origem australiana, o gênero *Eucalyptus* é composto por, aproximadamente, 600 espécies, onde cerca de 100 delas são utilizadas para fins comerciais no mundo. A capacidade de adaptação às diversas condições e o rápido crescimento, faz com que esse gênero seja uma das principais espécies utilizada para os mais diversos fins.

O gênero *Eucalyptus* foi introduzido no Brasil no século XIX, mas os primeiros registros de plantações comerciais e pesquisas são datados de 1904, no estado de São Paulo, onde se procurava uma solução para a produção de dormentes para ferrovias. Após esse período, foi notada a boa adaptação da espécie às condições do país e, de acordo com Chandler & Henson (1998), na década de 1940, foram estabelecidas plantações em regiões de mineração de ferro, para a produção de carvão vegetal, como uma alternativa energética para substituir o coque no processo de produção do minério de ferro na siderurgia.

De 1910 a 1966 o Brasil tinha, aproximadamente, 470 mil hectares de plantações florestais. A partir dessa data, o governo brasileiro criou uma lei de incentivos fiscais para plantações florestais e, com isso, a área de reflorestamento chegou a quase 6 milhões de hectares em 1987, com pequena redução na década de 90.

Atualmente, no Brasil, segundo a ABRAF (2011), a área ocupada por plantios de *Eucalyptus* e *Pinus*, totalizou 6,5 milhões de hectares, sendo 73% correspondente à área de plantios de *Eucalyptus* e 27% a plantios de *Pinus*. No mundo, a área plantada de *Eucalyptus* é estimada entre 16 e 19 milhões de hectares, tendo como principais objetivos a produção de celulose e papel, a fabricação de painéis de fibras e partículas, carvão vegetal, madeira roliça para a utilização na construção civil e em aplicações diversas na área rural.

A grande demanda por madeira, nos últimos anos, fez com que muitos agricultores investissem nesse tipo de cultura, atraídos pelo alto valor da madeira e, também, pelo seu uso múltiplo. Esse gênero também se mostra interessante pela alta produtividade em curtos ciclos, quando comparado a outras culturas florestais.



Figura 6.1 – Colheita de uma plantação de *Eucalyptus* com manejo tradicional.

O aumento de incremento na produtividade de plantios de eucalipto, nas últimas décadas, deve-se às pesquisas realizadas em relação ao melhoramento genético e às práticas silviculturais, tais como adubação, irrigação, tratos culturais, controle de pragas e doenças e espaçamento de plantio.

## Florestas energéticas

As plantações, com finalidades energéticas, são sistemas que visam uma maior produção de biomassa por unidade de área e num menor espaço de tempo. Assim, aliado ao conceito de plantações energéticas, surgiu o conceito de plantios de curta rotação (Müller, 2005).

O termo “florestas energéticas” apareceu na década de 1980 com Magalhães (1982) e foi utilizado para definir as plantações com grande número de árvores por hectare e, conseqüentemente, com ciclo curto, que também tinham como finalidade a produção do maior volume de biomassa por área em menor espaço de tempo. No entanto, essas experiências não apresentaram os resultados esperados, em função do pouco conhecimento técnico, da qualidade do material genético e do baixo desenvolvimento, no Brasil, da silvicultura naquela época. Esse período foi marcado, essencialmente, por uma maioria de plantios com baixa produtividade e grande mortalidade, além dos impactos sobre a fertilidade e a umidade do solo (Müller, 2005). Ainda, de acordo com os autores, o desenvolvimento da silvicultura de eucalipto, como fonte de insumo energético, foi fundamentado na produção de carvão vegetal para abastecer a indústria siderúrgica.

Para Macedo (2003), as altas produtividades obtidas em plantações florestais, particularmente do gênero *Eucalyptus*, tornaram menores os custos de geração da eletricidade com madeira de reflorestamento, deixando o investimento mais atrativo.

As características principais desejáveis em uma floresta energética são a alta produção de biomassa e ciclos de rotação curtos. Para o aproveitamento total da área, a tendência de se reduzir o espaçamento de plantio é uma técnica que está sendo muito estudada e tem demonstrado bons resultados.

Os espaçamentos comerciais, mais utilizados no Brasil, para o gênero *Eucalyptus* são de 3 x 3 m e 3 x 2 m, com densidades populacionais de, aproximadamente, 1100 e 1700 plantas por hectare, respectivamente. Técnicas de redução para 3 x 1 m e 3 x 0,5 m, com densidade populacionais de, aproximadamente, 3300 e 6700 plantas por hectares, respectivamente,

O ciclo da cultura do eucalipto, comumente adotado no país, está entre 5 e 7 anos, o que pode ser reduzido para 1 a 2 anos com o uso das técnicas de plantio adensado.

A utilização de plantios com espaçamento reduzido deve-se muito às técnicas de clonagem e melhoramento genético. Um fator importante para que o plantio de eucalipto adensado seja bem sucedido é a uniformidade das plantas, normalmente obtido a partir de clones. Para que ocorra o desenvolvimento homogêneo das plantas, baixa mortalidade e alto incremento de massa são necessários além da escolha adequada das mudas (oriundas de viveiros que apresentem programas de melhoramento genético e matrizes de alta produtividade), sistemas mecanizados de plantio e tratos silviculturais.

## Projeto florestas energéticas em Botucatu

Em dezembro de 2008, foram plantadas as mudas de clones do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em uma área experimental localizada numa altitude aproximada de 875 m e situa-se entre as longitudes 48°24'43" W e 48°26'21" W e entre as latitudes 22°58'10" S e 22°59'25" S.

O clima predominante no município de Botucatu, estado de São Paulo, segundo os critérios adotados por Koppen é Cfa, é o clima mesotérmico, com temperaturas médias superiores a 10°C, cuja temperatura do mês mais quente é igual ou superior a 22°C e o índice pluviométrico anual está em torno de 1516 mm.

O sistema florestal de curta rotação recebeu as adubações de plantio e de cobertura. A aplicação inicial consistiu em NPK (6-30-6), no plantio, nas doses de (1) 70, (2) 140 e (3) 280 g/planta; na cobertura, a adubação foi feita com NPK (20-0-20) adicionados os micronutrientes Zn (0,5%) e B (0,3%), aos 60, 140 e 360 dias de idade. Aos 60 dias as doses foram de (1) 25, (2) 50 e (3) 100 g/planta; aos 140 dias, (1) 35, (2) 70 e (3) 140 g/planta; aos 360 dias, (1) 50, (2) 100 e (3) 200 g/planta. Os cinco espaçamentos entre plantas ficaram nos valores de 0,5 m; 1,0 m; 1,5 m; 2,0 m; 2,5 m e a distância entre as linhas de plantio fixadas em 2,80 m para todos os tratamentos.

No experimento conduzido por Garcia e colaboradores (2009), comparando diferentes espaçamentos de plantio com *Eucalyptus urograndis*, foram observadas diferenças no desenvolvimento do diâmetro do colo das plantas. O espaçamento de 2,8 x 0,5m apresentou menores valores de diâmetro do colo em relação aos espaçamentos 2,8 x 1,5m e 2,8 x 2,5m. No Gráfico 6.3, podem ser observadas as médias dos diâmetros do colo das plantas aos 90 dias após o plantio.

Com a altura total das plantas, pode ser observada uma tendência de redução dos valores médios com o aumento do espaçamento (Gráfico 6.4). Embora o espaçamento de 2,8 x 0,5 m tenha culminado no maior valor médio na altura total, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos aos 90 dias após o plantio, com base no intervalo de confiança ao nível 95%.

A princípio foram feitas medições de diâmetro, altura e estimativa do volume através da utilização de um fator de forma. Para as colheitas realizadas aos 18 e 24 meses, período em que a floresta estava completamente

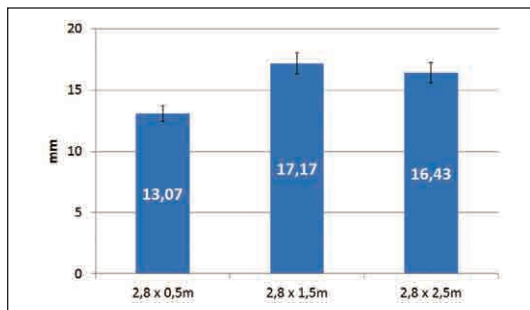


Gráfico 6.3 – Diâmetros do colo, em mm, das mudas de *Eucalyptus urograndis* nos três espaçamentos aos 90 dias após o plantio. As colunas indicam a média das repetições, enquanto as barras verticais apresentam o Intervalo de Confiança o nível de 95% (Garcia et al., 2009).

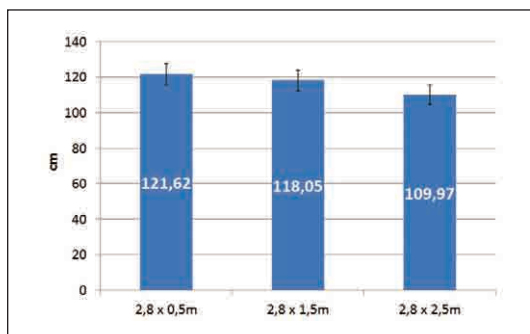


Gráfico 6.4 – Altura total, em cm, das mudas de *Eucalyptus urograndis* nos três espaçamentos 90 dias após o plantio. As colunas indicam a média das repetições, enquanto as barras verticais apresentam o Intervalo de Confiança ao nível de 95% (Garcia et al., 2009).

estabelecida (Figura 6.2), foi adotado o método da cubagem rigorosa para a obtenção do volume com casca, porcentagem de casca e coleta de discos para a determinação da densidade básica média das árvores (Soares et al., 2006).

O princípio de coleta de árvores-amostra considera a escolha de quatro árvores-modelo em cada parcela, o que significou colher árvores com DAP próximo ao diâmetro médio ou quadrático da população, conforme explica Soares e colaboradores (2006). A metade das amostras coletadas na região do DAP foi moída para determinação do poder calorífico superior e de algumas características químicas da madeira.



Figura 6.2 – Plantio do clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* no espaçamento de 2,8 x 0,5 m.

Os discos foram coletados em porcentagem da altura total (Figura 6.3) e a biomassa de folhas e galhos no campo, separadamente (Figura 6.4), foram determinados por meio de balança eletrônica com de precisão 0,1 kg.

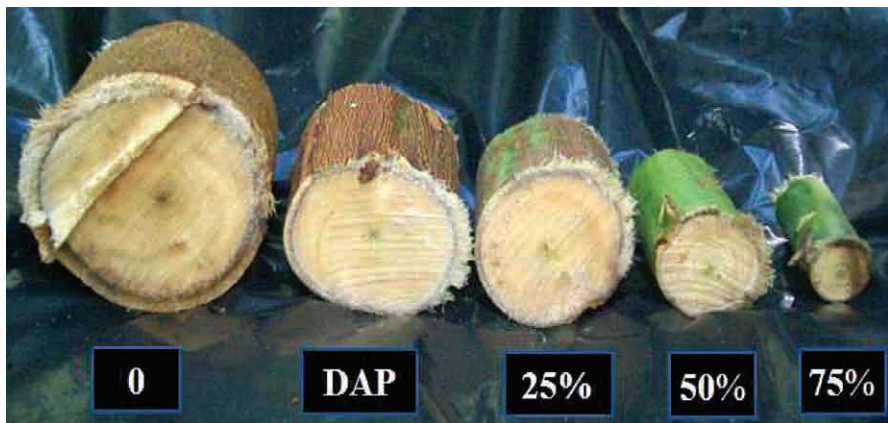


Figura 6.3 – Discos coletados em porcentagem da altura total para determinação de volume de madeira com casca e densidade básica média da árvore.



Figura 6.4 – Processamento para a pesagem da biomassa úmida de galhos e folhas no campo.

O cálculo de volume com casca foi realizado de acordo com as seguintes fórmulas:

$$V_i = \left( \frac{(AS_1 + AS_2)}{2} \right) * L$$

$$V_t = \sum V_i$$

Onde:

$V_i$ : volume da seção ( $m^3$ )

AS: área seccional ( $m^2$ )

L: comprimento da seção (m)

VT: volume total ( $m^3$ )

O cálculo da densidade básica média foi obtido da seguinte maneira:

$$DBM = \left( \frac{(DB0\% + DB1,3) * V1}{2} \right) + \dots + \left( \frac{(DB75\% + DB100) * V5}{2} \right) / VT$$

Onde:

DBM: densidade básica média ( $kg.m^{-3}$ )

DBn: densidade básica no disco na posição n, em porcentagem da altura total ( $kg.m^{-3}$ )

$V_n$ : volume da seção n ( $m^3$ )

VT: volume total da árvore ( $m^3$ )



A densidade básica média das árvores é de fundamental importância para o cálculo da biomassa seca de madeira com casca. Nota-se na Tabela 6.1 que, nos resultados obtidos no experimento, a biomassa seca de madeira com casca foi afetada pelo fatorial triplo adubação x espaçamento x idade de colheita (18 e 24 meses).

Tabela 6.1 – Análise de variância para a biomassa seca de madeira com casca, em t.ha<sup>-1</sup>

Fator de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	p-valor
Idade de Colheita (I)	1	1204,99	1205,0	39,57	0,00
Espaçamento (E)	4	10755,76	2688,9	88,31	0,00
Nível de Adubação (A)	2	3409,13	1704,6	55,98	0,00
I x E	4	1027,72	256,9	8,44	0,00
I x A	2	342,17	171,1	5,62	0,01
E x A	8	4508,34	563,5	18,51	0,00
I x E x A	8	997,60	124,7	4,10	0,00
Resíduo	90	2740,38	30,4		

Os dados foram submetidos a testes de médias que resultou na Tabela 6.2, que apresenta os resultados de produtividade em toneladas por hectare. O melhor resultado foi de 100,8 t.ha<sup>-1</sup>, obtido no tratamento 2,8 x 0,5 m, no nível 3 de adubação, colhido aos 24 meses após o plantio.

A determinação do poder calorífico superior foi realizada pelo método da bomba calorimétrica que, basicamente, consiste em medir a variação da temperatura da água pela energia emitida na forma de calor pela queima da madeira com casca. A qualidade de combustível pode ser rotulada pelo poder calorífico superior (PCS), que é definido como sendo a quantidade de energia liberada na forma de calor por unidade de massa de combustível, quando submetido à combustão completa. Para a determinação do PCS foi utilizado um calorímetro e a metodologia adotada foi o “Método da Bomba Calorimétrica”. O método consiste em queimar o combustível, no caso a madeira, em um sistema aproximadamente adiabático, e medir a variação de temperatura proporcionada pela queima da madeira numa certa quantidade de água com massa pré-estabelecida. A variação de temperatura registrada na água por um termômetro de mercúrio é proporcional ao calor liberado pelo combustível.

Tabela 6.2 – Biomassa de madeira com casca (BMC) em função da idade de colheita, do espaçamento e do nível de adubação

Idade (meses)	Espaçamento (m)	Nível de adubação	BMC (t.ha <sup>-1</sup> )
18	2,8 x 0,5	1	40,8 c
		2	51,2 c
		3	66,7 b
	2,8 x 1,0	1	41,0 c
		2	47,1 c
		3	47,6 c
	2,8 x 1,5	1	38,0 d
		3	41,4 c
		2	42,7 c
	2,8 x 2,0	1	30,1 h
		2	34,8 e
		3	34,9 e
2,8 x 2,5	1	22,6 h	
	2	29,7 h	
	3	32,8 f	
24	2,8 x 0,5	1	46,3 c
		2	55,4 b
		3	100,8 a
	2,8 x 1,0	2	38,1 d
		1	39,5 d
		3	47,3 c
	2,8 x 1,5	2	44,3 c
		1	45,9 c
		3	48,5 c
	2,8 x 2,0	1	35,6 e
		3	40,3 d
		2	46,3 c
2,8 x 2,5	1	31,7 g	
	2	35,6 e	
	3	41,2 c	

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ )

Os componentes de um calorímetro são:

- a) Bomba calorimétrica: recipiente de aço inox resistente onde é efetuada a queima do combustível.
- b) Termômetro de mercúrio: utilizado para determinar a temperatura inicial e final.
- c) Sistema de abastecimento de oxigênio: é necessário inserir oxigênio na bomba calorimétrica para facilitar a combustão.
- d) Recipiente ou vaso calorimétrico: recipiente com uma massa definida de água (2500 g), que irá trocar calor com a bomba calorimétrica.
- e) Sistema de Ignição: é um sistema que está ligado à rede elétrica por meio de duas aberturas existentes na bomba calorimétrica, no qual passa a corrente elétrica formando uma resistência em um fio de níquel-cromo, transpassando a amostra de madeira, que entra em combustão.

O poder calorífico superior é determinado pela seguinte equação:

$$PCS = [(K + M_{H_2O}) / (M_c)] * (T_f - T_i)$$

Onde:

K = constante do calorímetro determinada previamente, utilizando-se o ácido benzoico com PCS de 6318 cal.g<sup>-1</sup>; neste trabalho o valor de K foi de 489.

M<sub>H<sub>2</sub>O</sub> = massa de água pré-estabelecida em gramas (2500 g).

M<sub>c</sub> = massa seca da amostra de madeira.

T<sub>i</sub> = temperatura da água antes da combustão.

T<sub>f</sub> = temperatura da água obtida após a combustão.

Seguindo o procedimento explicado por Vale e colaboradores (2000), com os valores de poder calorífico (kcal.kg<sup>-1</sup>) da madeira com casca e a produção de massa seca (kg) pode-se obter a produção de energia (kcal). A energia produzida também pode ser expressa em termos de produtividade energética (Gcal.ha<sup>-1</sup>) e convertida para tep (tonelada equivalente de petróleo), como será apresentado mais adiante.

A tonelada equivalente de petróleo é o produto de um coeficiente resultante da razão entre o poder calorífico superior da madeira e do petróleo pela biomassa de madeira, em toneladas por hectare (Patusco, 1998).

Nota-se na Tabela 6.3 o desenvolvimento das árvores em diâmetro e em altura e que essas medidas, principalmente de diâmetro, começam a se diferenciar na idade de 18 meses.

Tabela 6.3 – Diâmetro a altura do peito (DAP) e altura total em função do espaçamento e dos níveis de adubação nas idades de 12 meses, 18 meses e 24 meses após o plantio.

Nível de adubação	Espaçamento (m)	Árvores/ha	DAP (cm)			ALTURA (m)		
			12	18	24	12	18	24
1	2,8 x 0,5	7143	5	6 (1)	6 (2)	7	11 (2)	10 (2)
	2,8 x 1,0	3571	5	7 (1)	7 (1)	6	11 (2)	13 (2)
	2,8 x 1,5	2381	5	8 (1)	9 (1)	7	11 (1)	13 (3)
	2,8 x 2,0	1786	5	9 (1)	9 (1)	6	11 (1)	13 (2)
	2,8 x 2,5	1429	5	9 (1)	10 (1)	6	10 (1)	13 (2)
2	2,8 x 0,5	7143	5	6 (2)	6 (2)	8	10 (2)	11 (3)
	2,8 x 1,0	3571	6	7 (1)	8 (1)	8	12 (2)	13 (2)
	2,8 x 1,5	2381	6	8 (1)	9 (1)	7	12 (1)	12 (1)
	2,8 x 2,0	1786	7	9 (1)	10 (1)	8	11 (1)	14 (2)
	2,8 x 2,5	1429	6	9 (1)	10 (1)	6	11 (1)	11 (1)
3	2,8 x 0,5	7143	5	6 (2)	7 (2)	8	11 (3)	12 (3)
	2,8 x 1,0	3571	6	8 (1)	8 (1)	7	12 (2)	13 (2)
	2,8 x 1,5	2381	6	8 (1)	9 (1)	7	11 (2)	13 (2)
	2,8 x 2,0	1786	6	9 (1)	10 (1)	7	11 (1)	13 (2)
	2,8 x 2,5	1429	6	10 (1)	11 (1)	7	12 (2)	13 (2)

Na Tabela 6.4, é possível observar o incremento em volume sendo que, na idade de 12 meses, o volume com casca foi calculado pelo produto resultante do volume cilíndrico por um fator de forma, para as outras idades é apresentada a média de quatro árvores-amostra cubadas pelo método de Smalian.

A densidade básica média e o poder calorífico superior da madeira com casca estão apresentados na Tabela 6.5, sendo dados obtidos nas colheitas dos 18 e 24 meses após o plantio. A densidade básica média foi obtida pela média ponderada das densidades obtidas em porcentagem de altura total em que o peso para a média foi o volume das seções e o volume total. Na literatura são encontrados valores de poder calorífico para a madeira semelhantes ou até inferiores aos obtidos no projeto, Lima e colaboradores (2007) avaliaram o poder calorífico de amostras coletadas na região do diâmetro a altura do peito (DAP) das árvores de *Eucalyptus benthamii*, aos seis anos de idade; encontraram poder calorífico médio de  $4681 \pm 487,6$  kcal.kg<sup>-1</sup>. Os valores de poder calorífico superior (PCS) de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* ficam entre 4501 e 4790 kcal.kg<sup>-1</sup> e 4422 e 4595 kcal.kg<sup>-1</sup> respectivamente, segundo Quirino e colaboradores (2005).

Tabela 6.4 – Volume com casca, em m<sup>3</sup>, em função do espaçamento, do nível de adubação e das idades de colheita, em meses.

Nível de adubação	Espaçamento (m)	Árvores/ha	Volume com casca (m <sup>3</sup> )		
			12	18	24
1	2,8 x 0,5	7143	0,0076	0,0134 (0,0014)	0,0155 (0,0023)
	2,8 x 1,0	3571	0,0074	0,0246 (0,0009)	0,0250 (0,0053)
	2,8 x 1,5	2381	0,0102	0,0319 (0,0025)	0,0422 (0,0050)
	2,8 x 2,0	1786	0,0099	0,0348 (0,0003)	0,0427 (0,0049)
	2,8 x 2,5	1429	0,0086	0,0323 (0,0013)	0,0476 (0,0044)
2	2,8 x 0,5	7143	0,0092	0,0166 (0,0021)	0,0200 (0,0023)
	2,8 x 1,0	3571	0,0128	0,0286 (0,0039)	0,0242 (0,0024)
	2,8 x 1,5	2381	0,0122	0,0368 (0,0026)	0,0392 (0,0072)
	2,8 x 2,0	1786	0,0175	0,0396 (0,0053)	0,0563 (0,0080)
	2,8 x 2,5	1429	0,0105	0,0417 (0,0038)	0,0523 (0,0033)
3	2,8 x 0,5	7143	0,0152	0,0213 (0,0026)	0,0336 (0,0025)
	2,8 x 1,0	3571	0,0128	0,0287 (0,0028)	0,0321 (0,0012)
	2,8 x 1,5	2381	0,0116	0,0370 (0,0056)	0,0464 (0,0035)
	2,8 x 2,0	1786	0,0126	0,0406 (0,0043)	0,0508 (0,0057)
	2,8 x 2,5	1429	0,0142	0,0457 (0,0031)	0,0625 (0,0047)

Tabela 6.5 – Densidade básica média e poder calorífico superior obtidos nas idades de 18 e 24 meses em função do nível de adubação e do espaçamento

Nível de adubação	Espaçamento (m)	DBM (kg.m <sup>-3</sup> )		PCS (kcal.kg <sup>-1</sup> )	
		18	24	18	24
1	2,8 x 0,5	423 (53)	418 (14)	4735 (73)	4809 (49)
	2,8 x 1,0	467 (10)	443 (10)	4784 (52)	4786 (27)
	2,8 x 1,5	502 (30)	458 (11)	4784 (38)	4774 (110)
	2,8 x 2,0	486 (4)	457 (9)	4822 (48)	4766 (66)
	2,8 x 2,5	491 (8)	471 (5)	4863 (86)	4727 (47)
2	2,8 x 0,5	432 (17)	390 (51)	4753 (60)	4729 (97)
	2,8 x 1,0	461 (20)	441 (13)	4824 (47)	4773 (80)
	2,8 x 1,5	486 (9)	454 (7)	4825 (26)	4764 (71)
	2,8 x 2,0	493 (13)	460 (10)	4808 (25)	4740 (23)
	2,8 x 2,5	499 (21)	477 (11)	4897 (88)	4807 (53)
3	2,8 x 0,5	439 (5)	421 (3)	4742 (88)	4718 (81)
	2,8 x 1,0	466 (8)	412 (12)	4775 (32)	4751 (109)
	2,8 x 1,5	469 (9)	430 (57)	4718 (62)	4790 (69)
	2,8 x 2,0	482 (19)	444 (10)	4804 (33)	4799 (74)
	2,8 x 2,5	503 (4)	461 (12)	4781 (98)	4809 (44)

A energia da madeira pode ser expressa em toneladas equivalentes de petróleo, o que dá subsídio para interpretações da área econômica no que diz respeito à substituição do combustível fóssil pela biomassa florestal. Do ponto de vista desta medida energética o tratamento 2,8 x 0,5 m com maior adubação gerou 88 tep.ha<sup>-1</sup>, em 24 meses, que foi significativamente maior que os outros tratamentos (Tabela 6.6).

Tabela 6.6 – Tonelada equivalente de petróleo (tep)

Espaçamento (m)	Nível de adubação	tep.ha <sup>-1</sup>	
		18 meses	24 meses
2,8 x 0,5	1	18	18
	2	23	45
	3	29	88
2,8 x 1,0	1	18	18
	2	21	42
	3	21	63
2,8 x 1,5	1	17	17
	2	19	38
	3	18	54
2,8 x 2,0	1	13	13
	2	15	31
	3	16	47
2,8 x 2,5	1	10	10
	2	13	26
	3	15	44

Outra abordagem importante para os projetos florestais de bioenergia é a avaliação econômica com uso de indicadores. Nesta pesquisa foi utilizado o método de avaliação econômica do grupo de métodos nos quais se considera a variação do capital no tempo (Silva et al., 2005). O VPL (valor presente líquido), o IBC (índice benefício/custo) e o CMP (custo médio de produção, considerando produção de briquetes) foram calculados, considerando o fluxo de caixa, os custos com insumos, tais como inseticida, herbicida, mudas, adubo e produção de briquetes. No cálculo das receitas foi considerado o preço de venda do briquete de R\$ 380 por tonelada, na qual está instalada a área experimental. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

O VPL é a diferença do valor presente das receitas menos o valor presente dos custos. Os tratamentos que apresentaram o VPL maior do que zero foram economicamente viáveis, sendo considerado o mais viável aquele que apresentou maior VPL. Foi considerada uma taxa de desconto (i) de 6 % ao ano.

$$\text{VPL} = \Sigma R(1 + i)^{-j} - \Sigma C(1 + i)^{-j}$$

Onde:

R = valor atual das receitas

C = valor atual dos custos

i = taxa de juros

j = período em que a receita ou o custo ocorrem

O índice de relação benefício custo foi obtido a partir da razão entre o valor atual das receitas e o valor atual dos custos. O tratamento foi considerado economicamente viável se o IBC for maior que 1.

$$\text{IBC} = \Sigma R(1 + i)^{-j} / \Sigma C(1 + i)^{-j}$$

O custo médio de produção consistiu em dividir o valor atual do custo pela produção total equivalente. Para que o tratamento ou projeto seja viável, o valor do CMP deve estar abaixo do preço do briquete no mercado (R\$ 380 por tonelada).

$$\text{CMP} = \Sigma CT(1 + i)^{-j} / \Sigma PT(1 + i)^{-j}$$

Onde:

CT = custo total atualizado em cada período

PT = produção total equivalente em cada período que, neste trabalho, foi considerada a produção de briquetes de madeira, 1,5 e 2,0 anos após o plantio. PT é a quantidade produzida descontada pela taxa de juros.

Os espaçamentos considerados adensados foram 2,8 x 0,5 m, 2,8 x 1,0 m e 2,8 x 1,5 m, dentre os quais o maior VPL foi de R\$ 2494.ha<sup>-1</sup> obtido no 2,8 x 1,5 m no nível 1 de adubação e considerando ciclo de corte de 2 anos (Tabela 6.7). O custo médio de produção (CMP) deve ser menor que o preço de venda praticado, que é de R\$ 380 por tonelada, o referido tratamento apresentou CMP de R\$ 213 por tonelada. Outros tratamentos mais adensados,

2,8 x 0,5 m e 2,8 x 1,0 m, podem ter seus custos amortizados por meio do manejo de brotação, por exemplo, um ciclo de corte de 1,5 anos resultaria em três colheitas, sendo duas colheitas de biomassa resultante de brotação, no período de 4,5 anos.

Tabela 6.7 – Valor presente líquido, R\$/ha (VPL), índice de relação benefício/custo (IBC) e custo médio de produção, R\$/tonelada (CMP)

Espaçamento (m)	Nível de Adubação	1,5 anos			2 anos		
		VPL	IBC	CMP	VPL	IBC	CMP
2,8 x 0,5	1	88	1	374	540	1,1	347
	2	-183	1	390	587	1,1	352
	3	-1190	0,9	431	1902	1,2	327
2,8 x 1,0	1	1539	1,4	265	833	1,3	301
	2	1512	1,3	283	817	1,2	316
	3	382	1,1	356	719	1,1	338
2,8 x 1,5	1	1668	1,6	236	2494	1,8	213
	2	1732	1,5	251	1848	1,5	247
	3	988	1,2	307	1721	1,4	275
2,8 x 2,0	1	1431	1,7	229	1886	1,8	213
	2	1472	1,6	244	2500	1,8	212
	3	969	1,3	292	1565	1,4	264
2,8 x 2,5	1	996	1,6	239	1755	1,8	206
	2	1280	1,6	239	1776	1,7	220
	3	1040	1,4	276	1858	1,6	240

Um experimento de florestas energéticas em andamento, em Botucatu-SP, resultou em dados de biomassa da parte aérea em função do espaçamento, níveis de adubação e idade de corte, verifica-se na Tabela 6.8 que há maiores porcentagens de madeira com casca em relação a biomassa seca total nos plantios mais adensados (2,8 x 0,5m, 2,8 x 1,0 m e 2,8 x 1,5 m), semelhante aos resultados alcançados por Leite e colaboradores (1997) na Figura 6.2. Por outro lado, espaçamentos tradicionais apresentaram porcentagem de galhos superior, o que evidencia haver mais resíduos florestais no ato da colheita.



Tabela 6.8 – Distribuição da biomassa de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* aos 18 e 24 meses após o plantio.

Espaçamento (m)	Nível de adubação	18 meses			24 meses		
		% galhos	% folhas	% mcc*	% galhos	% folhas	% mcc*
2,8 x 0,5	1	18	9	73	16	8	76
	2	16	8	77	17	9	74
	3	19	8	73	14	5	81
2,8 x 1,0	1	16	10	74	20	12	68
	2	20	8	71	29	11	60
	3	17	9	73	20	11	69
2,8 x 1,5	1	22	10	67	19	12	69
	2	20	10	70	24	11	65
	3	20	11	69	25	12	64
2,8 x 2,0	1	25	12	63	25	14	61
	2	26	11	63	21	12	67
	3	21	12	67	25	14	61
2,8 x 2,5	1	27	14	59	23	14	62
	2	21	13	66	22	14	64
	3	21	13	66	24	15	61

## Outros projetos florestais para fins energéticos

Em experimento realizado em Santa Bárbara, Minas Gerais, Leite e colaboradores (1997) avaliaram o efeito da densidade populacional sobre o crescimento de *Eucalyptus grandis*. O experimento foi conduzido com espaçamentos de 4 x 5m, 4 x 4m, 4 x 3m, 4 x 2m, 3 x 3m, 3 x 2m, 2 x 2m e 2 x 1m, sendo que a densidade populacional variou de 500 a 5000 plantas por hectare. As avaliações ocorreram aos 31 e 39 meses após o plantio, sendo que as diferenças em relação ao peso da biomassa das plantas podem ser observadas no Gráfico 6.5.

De acordo com esse gráfico, nota-se que, com a redução do espaçamento de plantio, foram obtidos valores superiores com relação ao peso da biomassa, sendo que o espaçamento de 2 x 2 m apresentou o maior peso. Com relação à distribuição do peso dos componentes da planta, o espaçamento também foi um fator relevante, como visto no Gráfico 6.6.

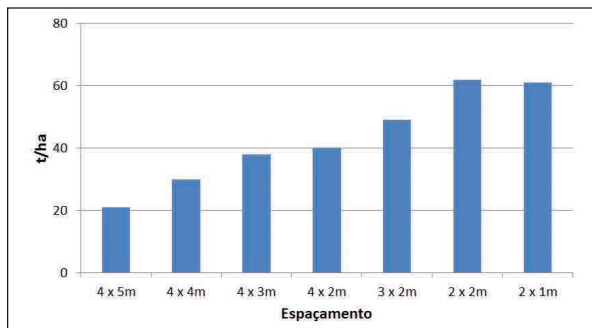


Gráfico 6.5 – Peso seco (t/ha) da biomassa de *Eucalyptus grandis* aos 39 meses após o plantio. Os valores são a soma das massas de lenho, casca, galhos e folhas (adaptado de Leite et al., 1997).



Gráfico 6.6 – Distribuição da biomassa de *Eucalyptus grandis* aos 39 meses após o plantio. (adaptado de Leite et al., 1997).

Com isso, os autores concluíram que os aumentos na densidade populacional proporcionaram incrementos de forma linear na produção de biomassa, por área, de todos os componentes da parte aérea e reduções no crescimento individual das plantas (Leite et al., 1997).

Em experimento instalado em Itamarandiba-MG, utilizando um clone híbrido oriundo do cruzamento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus camaldulensis*, Müller (2005) observou diferentes características da floresta aos 24 meses, em relação ao espaçamento de plantio. Foram analisados os espaçamentos de 3,0 x 0,5m, 3,0 x 1,0m, 3,0 x 1,5m, 3,0 x 2,0m e 3,0 x 3,0m.

Com relação ao DAP das plantas, o maior espaçamento, apresentou maior incremento mensal, como pode ser observado no Gráfico 6.7.

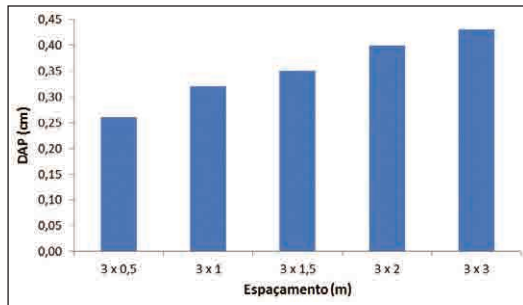


Gráfico 6.7 – Incremento médio mensal no DAP das plantas até os 24 meses após o plantio nos diferentes espaçamentos (Müller, 2005).

Nesse mesmo experimento, com relação à área basal da floresta, os autores observaram diferente comportamento, como apresenta o Gráfico 6.8.

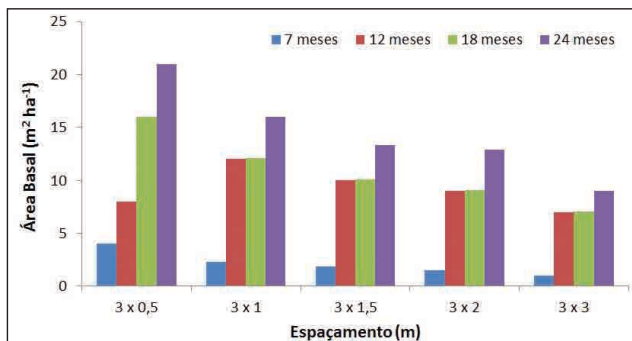


Gráfico 6.8 – Crescimento na área basal das plantas até os 24 meses após o plantio nos diferentes espaçamentos (Müller, 2005).

A curva de crescimento mais acentuada é observada no espaçamento 3 x 0,5m e a curva menos acentuada, no espaçamento 3 x 3m. Esta tendência se justifica em função da maior competição entre as plantas nos espaçamentos mais reduzidos, o que proporcionou maior incremento anual (Müller, 2005).

Ainda, com relação a esse experimento, os autores observaram diferenças no volume e peso da biomassa seca, onde foi observada uma relação direta com a densidade de plantio, ou seja, nos tratamentos com maiores densidades de plantio foram observados os maiores volumes de madeira e peso de biomassa seca, como apresentado nos Gráficos 6.9 e 6.10.

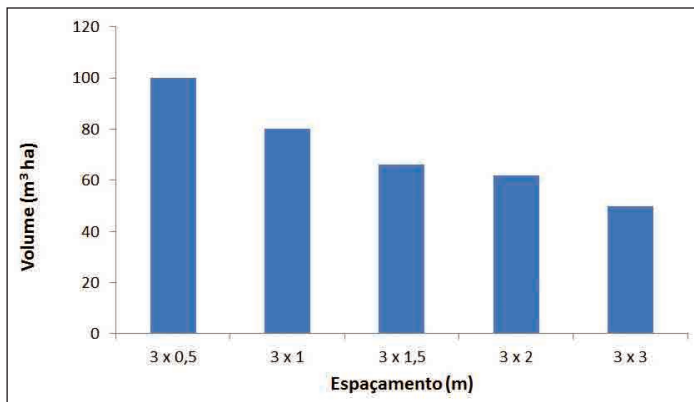


Gráfico 6.9 – Volume das plantas aos 24 meses após o plantio nos diferentes espaçamentos (Müller, 2005).

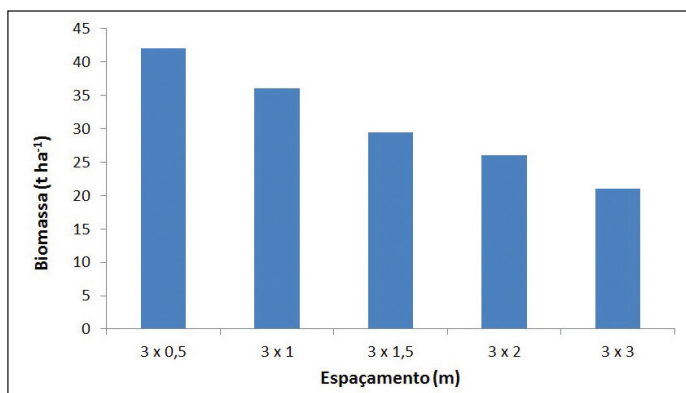


Gráfico 6.10 – Peso da biomassa florestal aos 24 meses após o plantio nos diferentes espaçamentos (Müller, 2005).

Com o tempo, a quantidade de madeira estocada em um determinado sítio, tende a se igualar para os diferentes espaçamentos, pois nos plantios mais densos ocorre a estagnação do crescimento das plantas em idades mais jovens e nos plantios com espaçamentos mais amplos a estagnação do crescimento ocorre em idades mais avançadas. Esse fato pode ser muito importante do ponto de vista econômico, visto que é possível economizar no custo de implantação e na colheita e transporte de madeira, nos espaçamentos maiores (Mello et al., 1971; Resende et al., 1983; Klein; Freitas, 1988;

Mora, 1986; Gorgulho et al., 1991; Ferreira et al., 1997; Lisita et al., 1997 citados por Müller, 2005).

A prática de se plantar eucalipto adensado já é realizada por algumas usinas de cana-de-açúcar, onde a biomassa é utilizada para a geração de energia elétrica nos meses em que não é realizada a colheita da cana (fora de safra).

O custo de implantação de florestas adensadas se difere de uma floresta tradicional apenas pelo aumento da quantidade de mudas por hectare, sendo que, a maioria das práticas silviculturais não sofre alterações no seu valor.

As florestas energéticas baseadas no sistema florestal de curta rotação, no Brasil, provavelmente, poderão ser conduzidas por pelo menos 2 ou 3 cortes, ou seja, uma ou duas rebrotas e, nesse caso, aumentará significativamente os ganhos e melhorará muito a rentabilidade do sistema.

Como exemplo de implantação bem sucedida de sistemas florestais de curta rotação para fins energéticos, pode-se citar o caso italiano com o manejo de florestas de *Populus* e *Salix*.

## Florestas energéticas de curta rotação na Itália

Na Itália, a produção de biomassa florestal é muito importante no abastecimento de usinas termoeletricas e centrais de aquecimento, sejam elas industriais ou residenciais. A dependência de fontes de energia não renovável, como petróleo e gás natural, fez com que o país buscasse cada vez mais, mudar as suas fontes de energia, devido à grande dependência econômica de países produtores de petróleo e pelas altas emissões de gases poluentes, originadas de combustíveis fósseis.

A proposta de se realizar estudos com áreas florestais de curta rotação (*short rotation coppice – SRC*) teve início ao norte da Itália, na região da Lombardia e Veneto, há mais de 10 anos. Com a liberação de subsídios para o estabelecimento e gestão desse sistema, em menos de cinco anos, 4.000 ha foram implantados. Atualmente, conforme o anuário florestal da região da Lombardia, esta área ultrapassa os 10.000 hectares.

As florestas de curta rotação italianas são, basicamente, do gênero *Populus* e *Salix*, pelo fato do conhecimento e familiaridade regional com as

características e comportamento destas espécies, do domínio das técnicas de clonagem e por apresentarem bom desenvolvimento para o clima local.

Basicamente o sistema florestal de curta rotação italiano é dividido em três tipos:

- 1) Sistema muito curto de rotação (*very short rotation*): a floresta é colhida em intervalos de 1 ano. A densidade de plantio adotada é de, aproximadamente, de 10.000 plantas/ha e as estacas (plantio através de propagação vegetativa) são plantadas em linhas duplas (Figura 6.5), com um espaçamento de 2,0 a 2,8 m entre as duas fileiras, 0,7 a 1,0 m entre as fileiras, formando um par, e 0,45 a 0,60 m ao longo das linhas entre as plantas. (Danfors et al., 1998). O diâmetro do caule das plantas na altura de corte atinge 2 a 3 cm no momento da colheita, com picos de 6 a 8 cm.

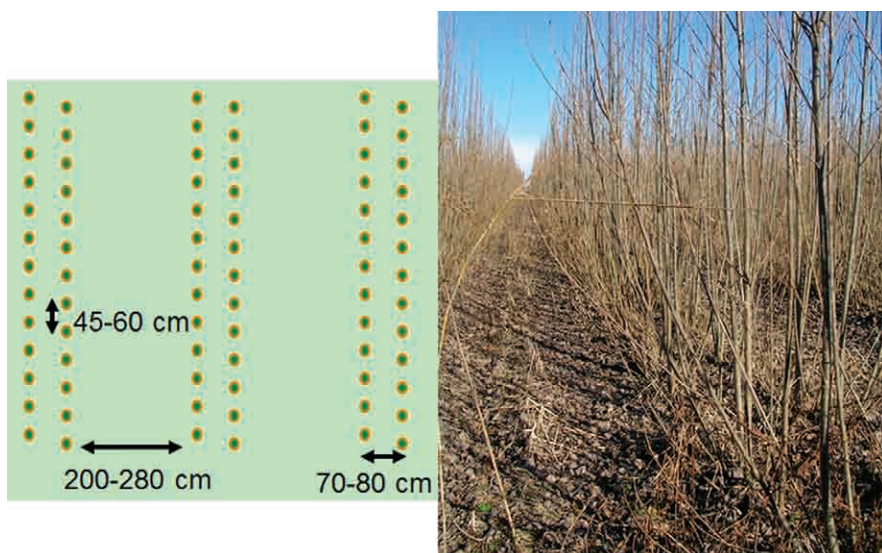


Figura 6.5 – Sistema muito curto de rotação (Foto: Gianni Picchi).

- 2) Sistema de curta rotação (*short rotation*): a colheita é realizada com intervalos de 2 a 3 anos. Nesse caso, as estacas são plantadas em fileiras simples, com um espaçamento de 2,5 a 3,0 m entre as linhas e 0,4 a 0,6 m ao longo das linhas, entre as plantas (Figura 6.6). Isso resulta em uma densidade populacional de 6.000 a 7.000 plantas/ha com diâmetro do caule de 10 a 12 cm (diâmetro na altura de corte).

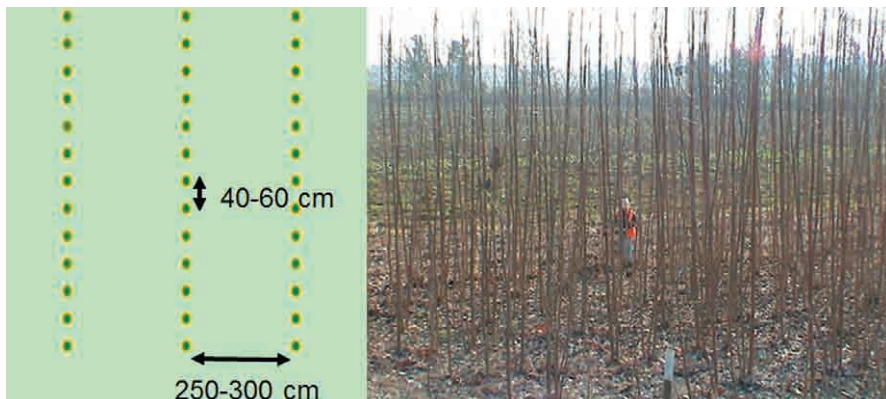


Figura 6.6 – Sistema de curta rotação (Foto: Gianni Picchi).

- 3) Sistema de média rotação (*medium rotation*): a colheita é realizada em intervalos de 5 a 6 anos. As estacas são plantadas em fileiras simples (Figura 6.7), com um espaçamento de 3 m entre as linhas e 2,0 a 2,5 m ao longo das linhas, entre plantas (1.300 a 1.700 plantas/ha). O diâmetro do caule (DAP), no momento da colheita, pode chegar a 15 cm.



Figura 6.7 – Sistema de média rotação (Foto: Gianni Picchi).

A colheita florestal para esses tipos de condução da floresta deve ser realizada com máquinas adaptadas para cada uma destas condições. Para cada sistema de manejo o corte é diferente, como exemplificado nas figuras 6.8, 6.9 e 6.10.



Figura 6.8 – Sistema de muito curta e curta rotação.



Figura 6.9 – Sistema de curta rotação.





Figura 6.10 – Sistema de média rotação.

Nesse tipo de sistema, toda a produção florestal é convertida em cavaco (Figura 6.11) e direcionada para a produção de biomassa diretamente ou processada na forma de briquetes ou pellets para melhorar suas características físicas e energéticas.



Figura 6.11 – Descarregamento dos cavacos.

## Equipamentos mecanizados para a colheita dos SFCR

O desenvolvimento de equipamentos para a colheita de florestas de curta rotação começou no início da década de 1990, e tem produzido uma série de benefícios econômicos e ambientais para os países que adotaram esse novo conceito de produção florestal. Vários projetos de construção de

máquinas e colhedoras simplesmente não evoluíram, acabando em poucos anos, por diferentes motivos técnicos, econômicos ou comerciais. Em outros casos, o trabalho de desenvolvimento intensivo em vários países europeus (Alemanha, Itália, Reino Unido e Suécia) e nos Estados Unidos, gerou algumas máquinas que estão trabalhando com sucesso e operam comercialmente nos países citados.

Ao todo, foram projetadas, produzidas e testadas, até agora, mais de trinta máquinas, muitas vezes, ainda somente disponíveis como protótipos ou versões não comerciais.

As máquinas que trabalham nas florestas de curta rotação podem e devem colher uma ou duas linhas de plantio ao mesmo tempo. Os sistemas de corte e recolhimento bifilar – linhas duplas - são geralmente projetados para um espaçamento de 75 cm a 100 cm, que foi desenvolvido para as condições de trabalho sueco, onde os plantios são realizados com linhas duplas de 75 e 125 cm. Na Suécia, o espaçamento duplo é usado para melhorar a interceptação da radiação solar e para facilitar a colheita mecanizada e, precisamente, permitir o corte simultâneo de dois fustes. Esse sistema é, agora, tão generalizado que pode ser chamado, por alguns de “sistema europeu”, porque, na verdade - com distâncias e objetivos um pouco diferente - é amplamente utilizado na Alemanha, Reino Unido e Itália.

Existem dois sistemas de colheita bem distintos, sendo que um fornece a biomassa cortada, agrupada e picada em uma operação contínua, impedindo a separação dessas três fases. Em geral, toda a operação é realizada por uma única máquina, e o material é transferido para as margens da estrada já na forma de cavacos.

O outro sistema depende da separação das fases de corte, agrupamento e trituração, que poderá ser realizado com máquinas e momentos diferentes.

O primeiro sistema, normalmente, é mais produtivo e mais simples em termos de organização, porém tem pouca flexibilidade e pode exigir equipamentos de grande porte. O segundo sistema é mais flexível, permite uma utilização parcial de equipamentos convencionais e permite que seja planejada a trituração, aguardando que a umidade dos fustes chegue a níveis ótimos. Há a possibilidade de deixar as plantas para secar por algumas semanas, o que passa a ser a vantagem mais interessante desse sistema, especialmente em climas úmidos.

Quanto à forma organizacional, é possível individualizar quatro esquemas típicos, com níveis crescentes de complexidade.

O primeiro sistema (01) inclui uma máquina de corte, trituração e extração sobre a linha lateral ou traseira.

O segundo sistema (02) utiliza duas máquinas: uma que corta os fustes, reúne e extrai para linha lateral, enquanto a outra faz a trituração, podendo ser, talvez, depois de algumas semanas.

O terceiro sistema (03), também, é baseado em duas máquinas: a primeira corta os fustes e coloca em leiras, enquanto a segunda recolhe os fustes das leiras, pica e carrega o cavaco de madeira para fora talhão.

Finalmente, o sistema 04, é baseado em três máquinas: usa uma máquina para cortar e agrupar os fustes, uma segunda máquina para recolher os feixes e carregá-los fora do campo e uma terceira máquina para picar.

Portanto, a máquina inovadora é sempre aquela que colhe, pica e remove o material, ou que os coloca em leiras. Os outros são equipamentos convencionais, normalmente utilizados na silvicultura e, portanto, já amplamente disponíveis.

As máquinas que realizam o corte e a trituração são muito potentes, com motores entre 450 a 1100 cv e, muitas vezes, são baseadas em uma máquina de colheita de forragens ou de cana-de-açúcar auto-propelidas adaptadas ao processamento de madeira, transformando uma árvore em cavacos ou lascas, de forma contínua.

Outro tipo de colhedora que pode ser encontrada são as colhedoras acopladas aos tratores agrícolas no sistema de três pontos e acionadas pela tomada de potência (TDP). As colhedoras acopladas aos tratores agrícolas são mais baratas, entretanto não podem alcançar a produtividade operacional horária dos modelos auto-propelidos de colheita contínua.

A escolha entre estas opções depende da disponibilidade de recursos e das características de campo (topografia, clima, solo) e não apenas dos aspectos técnicos da cultura. Onde existe uma boa rede de fornecedores, fabricantes ou revendas de máquinas e peças, pode ser mais conveniente o uso de equipamentos auto-propelidos; caso contrário, é melhor utilizar equipamentos aplicáveis a tratores agrícolas, deixando a cada produtor a liberdade de gerir os seus recursos como lhe convém.

Como forma de ilustrar o grau de desenvolvimento da colheita mecanizada dos sistemas florestais de curta rotação, a Tabela 6.9, apresenta os mais significativos protótipos e produtos avaliados, na última década, pelo CNR – IVALS (Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree).

Tabela 6.9 – Colhedoras florestais e estágio de desenvolvimento

Modelo	País (*)	Tipo	Produto	Primeira aparição	Estágio de desenvolvimento
<b>Máquinas para colheita</b>					
Saf-Isma	I	Arrasto	árvore inteira	1990	Terminado, em uso
Fröbbesta	S	Arrasto	árvore inteira	1993	Terminado, em uso
Dansalix	D	Montada	toras empilhadas	1993	Terminado, em uso
Berni	I	Montada	toras empilhadas	1995	Projeto abandonado
Hvidsted	D	Auto-propelido	toras empilhadas	1994	Terminado, em uso
Segerslätt	S	Auto-propelido	toras empilhadas	1994	Terminado, em uso
Rodster	S	Montada	toras empilhadas	1997	Produto comercial
Loughry	RU	Montada	toras em feixe “bundle”	1992	Projeto abandonado
Bundler SM	S	Montada	toras em feixe “bundle”	1998	Projeto abandonado
ESM 901	S	Auto-propelido	toras em feixe “bundle”	1992	Projeto abandonado
HS Locust	D	Auto-propelido	toras em feixe “bundle”	2001	Em desenvolvimento
<b>Máquinas para colheita e trituração – Sistema de 3 pontos (Montada)</b>					
Diemelstadt	A	Arrasto	Lascas	1994	Projeto abandonado
LWF	A	Arrasto	Lascas	2002	Em desenvolvimento
ATB-Potsdam	A	Arrasto	Lascas	2006	Em desenvolvimento
Isma – Tanesini	I	Arrasto	Cavaco	1997	Projeto abandonado
Bodini	I	Arrasto	Cavaco	2002	Projeto abandonado
Bender SM	Si	Arrasto	Cavaco	1992	Comercial
Gandini Bio93	I	Arrasto	Cavaco	1993	Projeto abandonado
Pallari	F	Arrasto	Cavaco	1987	Projeto abandonado
Spapperi	I	Arrasto	Cavaco	2004	Comercial
Spapperi	I	Arrasto	Lascas	2006	Em desenvolvimento
Optigep	H	Arrasto	Lascas	2005	Em desenvolvimento
<b>Máquinas para colheita e trituração – Sistema Autopropelido</b>					
MBB Biber	A	Auto-propelido	Cavaco	1994	Projeto abandonado
JD-Kemper	RU	Auto-propelido	Cavaco	1995	Projeto abandonado
Austoft 7700	S	Auto-propelido	Cavaco/Lascas	1993	Comercial
Claas HS-1	A-S	Auto-propelido	Cavaco	1993	Comercial
CRL	RU	Auto-propelido	Cavaco	1999	Comercial
Claas HS-2	A-S	Auto-propelido	Cavaco	2001	Comercial
Claas GBE	A-I	Auto-propelido	Cavaco	2004	Comercial
Krone	A	Auto-propelido	Cavaco	2007	Comercial
NH FR – 130B	B	Auto-propelido	Cavaco	2008	Comercial

(\*) A – Alemanha; B – Bélgica, D – Dinamarca, F – Finlândia, H – Hungria, I – Itália, RU – Reino Unido, S – Suécia, Si – Suíça

Em alguns casos, a máquina descrita na tabela é realmente o expoente de uma geração inteira de equipamentos similares produzidos em versões diferentes, dependendo do estágio de desenvolvimento de projeto específico e, muitas vezes, ainda é disponível em várias versões.

Esse é o caso da colhedora de forragens autopropelida fabricada pela Claas, produzido em, pelo menos, cinco versões diferentes (modelo Jaguar 695, 840, 860, 880 e 900) e que permite a utilização de diversos cabeçalhos de colheita florestal, tais como: dois modelos alemães (HS1 e HS2), um modelo francês (Cemagref) e dois modelos italianos (GBE e Veneta Maiz)

### Colhedora para corte contínuo de floresta no Brasil

No Brasil, a pesquisa e desenvolvimento de colhedoras auto-propelidas para os sistemas florestais de curta rotação é uma novidade e, está se iniciando através de uma parceria entre a New Holland (CNH) e a Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp, *campus* de Botucatu/SP.



Figura 6.12 – Colhedora New Holland FR 9060 Copping Header 130 FB em operação na Europa.

Esse projeto cooperativo está sendo executado pela FCA/Unesp, através do NEMPA (Núcleo de Ensaio de Máquinas e Pneus Agroflorestais), que é responsável pela condução do projeto de avaliação do desempenho operacional de uma colhedora florestal – New Holland FR 9060 Coppice Header 130 FB (Figura 6.12) – projetada para colher de forma contínua toda a biomassa de sistemas florestais de curta rotação (SFCR), avaliando os parâmetros operacionais, econômicos e ambientais desse novo e revolucionário sistema de produção. O projeto, com duração prevista de três anos, tem por objetivo determinar a viabilidade operacional e econômica desta colhedora, as necessidades de manutenção e a adaptação aos SFCR nacional.

### **Produtividade e custos das colhedoras de corte contínuo de floresta**

Atualmente, existem dados confiáveis sobre a produtividade da colheita de muitas das máquinas listadas na Tabela 1. Em geral, os dados disponíveis hoje indicam uma relação diretamente proporcional entre a produtividade da máquina, sua potência e a densidade de biomassa por hectare.

Entre as máquinas que executam o corte, recolhimento e trituração, as colhedoras de forragens auto-propelidas, adaptadas com cabeçotes florestais (sistema industrial), são as mais eficientes que os equipamentos acoplados em tratores agrícolas ou de arrasto (sistema semi-industrial), especialmente porque elas têm uma potência adequada para uso industrial.

Em um talhão com condução bem planejada, considerando o sistema de colheita mecanizado, pode-se esperar uma capacidade operacional de mais de 40 toneladas de cavaco de madeira por hectare (base úmida).

O custo horário desse sistema de colheita e transporte, composto por uma colhedora de forragens adaptada a colheita florestal mais três tratores de apoio para transporte dos cavacos, deve atingir valores de até € 500/hora (quinhentos euros por hora ou, aproximadamente R\$ 1.200,00/hora). Nesse cenário, a operação destas máquinas apresenta um custo € 12,5 por tonelada de cavaco (doze euros e cinquenta centavos por tonelada ou, aproximadamente R\$ 30,00 por tonelada).

Para os equipamentos acoplados (montados) no trator agrícola ou de arrasto, que apresentam um custo muito mais baixo de aquisição e de ope-

ração, pode ser estimado um valor ao redor cerca de € 250/hora (duzentos e trinta euros por hora ou, aproximadamente R\$ 600,00/hora), incluindo dois tratores de apoio para receber os cavacos. No entanto, a produtividade é muito mais modesta e não chega a 10 toneladas de cavaco (base úmida) por hora de trabalho.

O centro de pesquisa italiano CNR – Ivalsa avaliou e analisou todas as máquinas descritas e, pode concluir que, o custo de colheita e transporte com um sistema semi-industrial custa € 25/tonelada (vinte e cinco euros por tonelada ou, aproximadamente R\$ 60,00/tonelada), ou seja, quase € 13/tonelada (treze euros por tonelada ou, aproximadamente R\$ 31,00) a mais do que com uma colhedora autopropelida.

Desta forma, para que o sistema florestal de curta rotação seja viável economicamente, o plantio deve apresentar alto rendimento por hectare e a colheita deve ser realizada de forma contínua. No entanto, é necessário que o diâmetro das árvores, na altura de corte, seja proporcional à capacidade de cada equipamento.

## **Sistemas de aquecimento doméstico ou centrais de aquecimento**

O consumo de bioenergia está crescendo de maneira consistente na Europa, tanto para geração de eletricidade como para o aquecimento da água ou para centrais de energia. Esse mercado de biomassa, que era puramente regional, se tornou uma oportunidade de negócios internacional, segundo a APC (2006), e o desenvolvimento desse mercado deve incorporar novas políticas energéticas, agrícolas, florestais e industriais em todo o mundo.

Diversos países europeus, tais como, Suíça, Alemanha, França, Áustria e os países nórdicos utilizam e incentivam, financeiramente, através de programas de fomento e leis, a aquisição e a troca por equipamentos mais modernos, dos sistemas de aquecimento doméstico como fonte de energia limpa, eficiente e segura. A Bélgica é, segundo Verma e colaboradores (2009), o país mais ativo na utilização de biomassa como fonte de energia para aquecimento, com 83,5 MW consumidas em 2007. Um estudo técnico-econômico realizado por Chau e colaboradores (2009) demonstrou que

a instalação de aquecedores à base de resíduos madeireiros ou “pellets” para aquecimento de estufas agrícolas, gerando de 40% a 60% da demanda de calor, se torna mais econômico quando comparado a um aquecedor a gás natural funcionando a plena carga.

A utilização da biomassa florestal como combustível para geração de energia ou calor é uma ciência bastante complexa e, suas propriedades físicas e químicas, principalmente, o tamanho do cavaco, influenciam diretamente nas características da queima, de uma forma muito complexa, conforme relatado por Molcan e colaboradores (2009) e Lu e colaboradores (2010)

## Considerações finais

Dada a baixa utilização da biomassa florestal na matriz energética brasileira, o plantio adensado de eucalipto para a geração de energia torna-se uma nova realidade, sendo que algumas empresas já estão adotando esta prática para complementar suas demandas energéticas.

A técnica de adensamento dos plantios com eucalipto é recente e está sendo difundida devido os resultados de pesquisas e as avaliações de campo realizados por diversas instituições, pesquisadores e empresas. A tendência de adensamento dos plantios de eucalipto para produção de biomassa é reforçada pelo fato da necessidade de redução do ciclo da cultura, resultando em ganhos de produtividade, tempo e custo com o manejo florestal.

Em alguns países como, por exemplo, a Itália, a técnica de adensamento florestal vem sendo utilizada com sucesso para outras espécies florestais, sendo uma interessante estratégia econômica para a redução da dependência energética do país com relação a fontes fósseis importadas.

O Brasil, por sua vez, necessita de grandes investimentos em pesquisa na área de aproveitamento energético de biomassa, através da utilização de técnicas sustentáveis para geração e cogeração de energia limpa e renovável. Dada a complexidade ambiental, social e econômica para a implementação do sistemas florestais de curta rotação, é necessário o aprimoramento de diversos setores de sua cadeia florestal, desde o melhoramento genético, práticas silviculturais, até os sistemas de corte, transporte e beneficiamento da biomassa.



É muito provável que o *Sistema Florestal de Curta Rotação* com fins energéticos venham a ser, em pouco tempo, mais uma grande opção brasileira para produção de energia limpa e renovável!

## Referências bibliográficas

- ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. *Anuário estatístico da ABRAF 2011*: ano base 2010. Brasília, 130 p., 2011. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF10-BR.pdf>> Acesso em: 30 maio 2011.
- BRITO, J. O. O uso energético da madeira. *Estudos Avançados*, São Paulo, v.21, n.59, 2007.
- CHANDLER, D.; HENSON, R. *Brazilian experiences in the production of Eucalyptus for energy*. Brasília: Winrock International, 1998.
- DANFORS B.; LEDIN S.; ROSENQVIST H. *Short-rotation willow coppice grower manual*. Uppsala, Sweden: Swedish Institute of Agricultural Engineering, 1998.
- GARCIA, E. A.; SALVADOR, J. F.; GUERRA, S. P. S.; LANÇAS, K. P. Avaliação de mudas de *Eucalyptus urograndis* em diferentes espaçamentos para produção de biomassa no município de Botucatu (SP). In: CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE FLORESTAS ENERGÉTICAS, 1. *Anais...* Belo Horizonte, 2009.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *O Brasil já tem 180 milhões de habitantes*. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em 27 ago. 2007.
- LEITE, F. P.; BARROS, N. F.; NOVAIS, R. F.; SANS, L. M. A.; FABRES, A. S. Crescimento de *Eucalyptus grandis* em diferentes densidades populacionais. *Revista Árvore*, v.21, n.3, p.313-21, 1997.
- LIMA, E. A.; SILVA, H. D.; MAGALHÃES, W. L. E.; LAVORANTI, O. J. Caracterização individual de árvores de *Eucalyptus benthamii* para uso energético. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, n.35, Embrapa Florestas, Colombo (PR), 2007.
- LU, H.; IP, E.; SCOTT, J.; FOSTER, P.; VICKERS, M.; BAXTER, L. Effects of particle shape and size on devolatilization of biomass particle. *Fuel*, v.89, n.5, p.1156-68, 2010.
- MACEDO, I. C. *Estado da arte e tendências tecnológicas para energia*. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos – CGEE, Brasília, 2003. 90p. Disponível em: <[http://www.finep.gov.br/fundos\\_setoriais/ct\\_energ/documentos/ct-energ03estado\\_arte.pdf](http://www.finep.gov.br/fundos_setoriais/ct_energ/documentos/ct-energ03estado_arte.pdf)>. Acesso em: 31 maio 2009.
- MAGALHÃES, J. G. R. Tecnologia de obtenção da madeira. In: *Uso da madeira para fins energéticos*. Belo Horizonte, MG: Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – Cetec, 1982. p.56-66.
- MME – Ministério de Minas e Energia. *Balanco Energético Nacional 2006*: Ano base 2005. Brasília, 2006. Disponível em: <[http://ben.epe.gov.br/downloads/BEN2006\\_Versao\\_Completa.pdf](http://ben.epe.gov.br/downloads/BEN2006_Versao_Completa.pdf)>. Acesso em: 28 ago. 2007.

- MOLCAN, E.; LU, G.; LE BRIS, T.; YAN, Y.; TAUPIN, B.; CAILLAT, S. Characterization of biomass and coal co-firing on a 3 MWth Combustion Test Facility using flame imaging and gas/ash sampling techniques. *Fuel*, v.88, n.12, p.2328-34, 2009.
- MÜLLER, M. D. *Produção de madeira para geração de energia elétrica numa plantação clonal de eucalipto em Itamarandiba*. Viçosa, 2005. 108 fls. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.
- QUIRINO, W. F.; VALE, A. T.; ANDRADE, A. P. A.; ABREU, V. L. S.; AZEVEDO, A. C. S. Poder calorífico da madeira e de materiais ligno-celulósicos. *Revista da Madeira*, n.89, p.100-6, 2005.
- SILVA, M. L.; JACOVINE, L. A. G.; VALVERDE, S. R. *Economia florestal*. 2.ed., Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- SMITH, E. B. *Determinação da rotação econômica para Eucalyptus grandis (W. Hill ex Maiden), destinado à produção de carvão vegetal*. Viçosa, 1989. 69fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Viçosa.
- SOARES, C. P. B.; PAULA NETO, F.; SOUZA, A. L. *Dendrometria e inventário florestal*. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- PATUSCO, J. A. M. Eletricidade no balanço energético nacional. *Economia e Energia*, ano 2, n.11, 1998. Disponível em: <<http://www.ecen.com>>. Acesso em: 18 maio 2011.
- VALE, A. T.; BRASIL, M. A. M.; CARVALHO, C. M.; VEIGA, R. A. A. Produção de energia do fuste de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* em diferentes níveis de adubação. *Cerne*, v.6, n.1, p.83-88, 2000.



## **Parte II**

# Produção de biocombustíveis



## 7

# A complexidade da produção do bioetanol em fermentações abertas de matérias-primas industriais

Cecília Laluce, Elson Longo,  
Sandra Regina Pombeiro-Sponchiado, Eduardo Maffud Cilli,  
Jessica C. Medina Gallardo, Maria Olivia Campos Masiero

## Introdução

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o eucarioto mais conhecido em função de sua importância histórica, sendo o principal agente responsável pela fabricação de pães, bebidas e, recentemente, usado para produção de etanol combustível. As razões do uso amplo e diversificado dessa levedura são crescimento rápido, facilidade de manipulação genética, literatura vasta e diversificada, disponibilidade de banco de dados cinéticos e de sequências gênicas. O genoma da *S. cerevisiae* foi o primeiro a ser completamente sequenciado e contém um total de 12.052 megabases (Mb) distribuídos em 16 cromossomos. Mais de 80% deste genoma (cerca de 5.780 genes) encontra-se anotado em bancos de dados internacionais e contribui com informações valiosas, tais como microarranjos (*microarrays*), transcriptoma (expressão gênica) e genoma funcional (*genome-wide function*).

A levedura *S. cerevisiae* utiliza um grande número de fontes de carbono para crescer, sendo a glicose (hexose) sua fonte de carbono preferencial. A utilização de pentoses (como a xilose) é limitada pelo fato de os genes relacionados com a utilização destes açúcares não serem suficientemente expressos em *Saccharomyces cerevisiae* (Young et al., 2010). A utilização de polissacarídeos (amido ou a lignocelulose da parede das células vegetais) pela levedura *S. cerevisiae* depende da secreção de enzimas como amilases

e hemicelulases, as quais são usualmente produzidas por bactérias e outros fungos. A biologia molecular tem obtido grande sucesso com a expressão heteróloga de enzimas envolvidas na utilização de hidrolisados do material lignocelulósico pela levedura *S. cerevisiae*. Enzimas da via das pentoses de outros microrganismos também já foram clonadas na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Bettiga et al., 2008; Bettiga et al., 2009).

A utilização de uma fonte de carbono é rigorosamente regulada e depende da disponibilidade de oxigênio molecular no meio. Apesar de possuir um metabolismo facultativo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* prefere obter energia por meio da atividade de fermentação, mesmo em presença de oxigênio (efeito Crabtree). Por outro lado, o etanol é consumido por meio de metabolismo oxidativo (respiração) com formação de biomassa. O crescimento aeróbico (metabolismo oxidativo dependente de oxigênio) é favorecido durante o cultivo em quimiostato quando a concentração de glicose for baixa (Fiechter; Von Meyenburg, 1968). Assim, o metabolismo respiratório predomina em vazões baixas de alimentação. Em meios contendo concentrações altas de glicose, ocorre a repressão catabólica de diversos genes, que causa alterações na concentração intracelular de metabolitos, modificação na secreção de enzimas e estabilidade dos RNAs mensageiros (Gancedo, 2008).

Para que se possa entender, controlar e introduzir melhorias na produção de etanol é imprescindível um conhecimento biotecnológico bastante amplo e diversificado em relação aos seguintes aspectos:

- metabolismo das leveduras;
- taxonomia e microbiologia;
- identificação de contaminantes microbianos;
- controle de contaminantes durante as fermentações e,
- conhecimento sobre a tecnologia das fermentações.

Nas fermentações industriais, nas quais os meios não são esterilizados, as leveduras e contaminantes (bactérias e leveduras selvagens) competem entre si por nutrientes, sendo que a dominância e permanência de um determinado microrganismo no processo dependem de seu grau de crescimento, das interações entre os diferentes subprodutos do metabolismo e dos diversos tipos de levedura e contaminantes presentes. A superioridade quanto

a atividade de crescimento é fator determinante para a dominância da(s) linhagem(ns) de levedura no processo.

O sucesso da implantação do processo industrial é indicado pela manutenção da viabilidade celular e das atividades tanto de fermentação quanto de crescimento e depende também da propagação do inóculo e de sua atividade fisiológica, do número de leveduras industriais utilizadas como inóculo, da temperatura do meio de fermentação e, por fim, do monitoramento adequado do processo. A toxicidade da matéria-prima e a competição entre as leveduras da biota natural afetam a viabilidade celular, a capacidade de multiplicação e a produção de etanol.

## **O uso de leveduras selecionadas e variações na população de células ao longo da fermentação**

A produção de etanol em nosso país teve início com o uso de leveduras de panificação como inóculo. No entanto, os avanços na produção de etanol combustível foram alcançados com base nos estudos e práticas bem-sucedidas na fabricação de bebidas, sobretudo na produção de vinhos.

A maioria das leveduras comerciais destinadas à fabricação de vinhos apresenta as seguintes características: desempenho fermentativo, tolerância ao etanol produzido, níveis reduzidos de metabolitos indesejáveis e aumento nos níveis dos metabolitos desejados (Cordero-Bueso et al., 2011). Uma grande variedade de linhagens de leveduras melhoradas, resultantes do uso de técnicas da engenharia genética, está disponível para utilização industrial, desde que o produtor vislumbre lucros sem nenhum impacto negativo sobre o ambiente e consumo de produtos por humanos (fonte de vitaminas) e animais (ração).

### **Leveduras secas ativas**

Atualmente, a maioria das vinícolas utiliza leveduras secas ativas que permitem fermentações rápidas e reduzem os riscos de ocorrência de fermentações lentas (*sluggish fermentation*) ou interrupção do processo (*stuck fermentation*). A dificuldade da implantação de uma levedura seca ativa em um processo tem sido atribuída à etapa de secagem e a longos períodos de



reidratação (Henschke, 1991). O tempo necessário para o início da fermentação ou partida do processo dependerá da viabilidade celular e outros fatores, tais como as condições de estocagem do fermento, o estágio da reidratação e características do mosto (ibidem). Após os estágios da reidratação e propagação, nos quais a levedura seca ativa é suposta a se recuperar das perdas ocorridas durante o processo de secagem, é fundamental que as células reidratadas sejam capazes de fermentar eficientemente.

### **Leveduras selecionadas para a produção de etanol combustível**

A partir da década de 1990, as destilarias brasileiras passaram a utilizar linhagens de levedura *S. cerevisiae* selecionadas entre os isolados, obtidas ao longo do processo fermentativo. A primeira levedura a ser usada industrialmente como *starter* foi a linhagem IZ-1904, do Departamento de Biologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq/USP), em Piracicaba (SP).

Um dos primeiros trabalhos exaustivos de isolamento e construção de linhagens de leveduras utilizando isolados de destilarias foi realizado em nosso laboratório nos períodos de 1985 a 1987 (Fundo de Incentivo à Pesquisa Técnico-Científica do Banco do Brasil, Convênio Unesp/Fipecc n.1/1377-4) e de 1989 a 1992 (Fundação Banco do Brasil, Convênio Unesp-FBB n.10/1078-2). Embora o repasse dessas leveduras para a escala industrial de produção de etanol não tenha ocorrido por falta de interesse do setor alcooleiro na época, várias publicações resultaram desses trabalhos (Peres et al., 2001; Sousa et al., 2001). Por fim, estas leveduras foram avaliadas, quanto ao uso em panificação graças ao interesse da produtora de fermentos “Produtos Alimentícios Fleischmann & Royal Ltda.”. Leveduras capazes de fermentar dextrina com alto rendimento alcoólico e secretar enzimas com atividade amilolítica também foram obtidas (Laluce et al., 1988) e algumas das leveduras isoladas também mostraram alta capacidade de flotação (Sousa et al., 2001). As leveduras que apresentaram o fenômeno da flotação mostraram grande atividade fermentativa e suas células permaneceram dispersas no meio até o final da produção de etanol. Estas células dispersas no meio de cultivo só foram posteriormente separadas por meio da injeção de ar na cultura (Palmieri et al., 1996).

Outros pesquisadores também realizaram trabalhos sobre o isolamento de leveduras e muitas delas têm se mostrado boas leveduras *starters* no processo de fermentação do melaço ou xarope. Linhagens de leveduras de diferentes origens (linhagens TA, BG1, CR1, SA1, M26, Y-904, PE-2, PE-5, VR-1, BR-1, BR-2, ME-2, VR-2, MA-3, MA-4, CAT-1, CB-1, NR-1, BT-1, AL-1) foram avaliadas quanto a permanência (% ou proporção da levedura *starter* com menor capacidade de competir frente às leveduras selvagens no final da safra de produção de etanol) e prevalência ou dominância (% ou proporção da levedura *starter* com maior capacidade de competir frente às outras leveduras) em escala industrial, sendo que a linhagem PE-2 se destacou pelos resultados quanto à permanência ( $58\% \pm 4,1$ ) e a prevalência ( $54\% \pm 5,2$ ) no processo (Basso et al., 2008). A levedura BG-1 apresenta uma prevalência maior ( $65\% \pm 4,8$ ), mas a sua permanência é menor ( $42\% \pm 5,1$ ). Por outro lado, a linhagem BG-1 requer mecanismos que reduzem a assimilação de açúcares quando a temperatura se eleva, evitando perdas em viabilidade (Souza et al., 2007b). Desta forma, os requisitos de uma boa linhagem industrial para a produção de etanol combustível são um bom desempenho fermentativo, a manutenção de alta viabilidade, a produção de níveis reduzidos de glicerol externo e espuma durante ciclos sucessivos de fermentação (Basso et al., 2008).

## Uso de mais de uma levedura como inóculo

Há controvérsias quanto às vantagens do uso de mais de uma linhagem de levedura na partida de um processo ou mesmo quando inoculadas em sequência durante a fermentação. Experiências têm mostrado que o uso de leveduras comerciais selecionadas não garante a uniformidade do produto final (por exemplo, manutenção de sabor e aroma em vinhos) e também não assegura a implantação destas leveduras no processo (Capece et al., 2010). Em algumas amostras de mosto de uva, estes mesmos autores observaram que o grau de implantação de duas linhagens selecionadas foi baixo. Isso foi atribuído a diferenças na capacidade de essas leveduras tornarem-se dominantes na microflora presente no mosto, bem como as flutuações na diversidade dos contaminantes ao longo do processo.

## Permanência e prevalência de leveduras em um processo

Alguns fatores determinantes da sobrevivência e predominância de uma levedura no início do processo de fermentação são os seguintes (Barrajón et al., 2010):

- disponibilidade de hidratos de carbono de reserva;
- disponibilidade e tipos de fonte de nitrogênio;
- nível de leveduras selvagens; e
- quantidade da levedura *starter* utilizada como inóculo.

Os teores de trealose indicam o grau de robustez dos inóculos. Apesar da quantidade alta da trealose intracelular das leveduras comerciais, há evidências de que estas podem apresentar um grau menor de vitalidade (atividade biológica) no processo e menor grau de implantação (ibidem). Segundo estes autores, a exigência por aminoácidos depende da linhagem de levedura. Em geral, as leveduras comerciais consomem mais aminoácidos que leveduras recém-propagadas ou selvagens.

O grau de dominância das leveduras inoculadas depende das condições do processo (variáveis físicas do ambiente e/ou estado nutricional da matéria-prima). A ideia de que a dominância de uma levedura selvagem diminui à medida que a levedura *starter* passa a dominar no processo é também controversa. O meio diferencial WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient Agar) é o mais utilizado para monitorar as variações que ocorrem na população de leveduras durante o processo de fermentação, tanto em fabricação de bebidas (Powell; Diacetis, 2007) quanto em fabricação de etanol combustível. A persistência das leveduras *starters* selecionadas para partida de um processo de fermentação (detectada pela análise dos perfis cromossômicos e/ou análise do mtDNA) e a influência dessas leveduras sobre a condução da fermentação tem sido bastante estudada na fabricação de vinhos (Querol et al., 1992; Cordero-Bueso et al., 2011). Em alguns casos, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* não são capazes de competir com sucesso frente às leveduras selvagens do mosto de vinho e, assim, não podem se tornar dominantes em uma população de leveduras (Querol et al., 1992). Nas fermentações espontâneas, a dominância da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na população varia com a vinícola (Santamaría et al., 2005).

## Dinâmica populacional

Independentemente do inóculo ou *starters* usados, outras leveduras podem se originar de espécies contaminantes presentes no processo de fermentação, como indicado pela diversidade das linhagens de leveduras identificadas durante a fermentação de mostos de vinho (Fleet, 2008). Esta diversidade representa um desafio para a condução e controle de um processo industrial. A adaptação evolutiva é um fator determinante no aparecimento de leveduras diferentes durante o processo de fermentação. Mutantes isolados de mosto de uva mostram alterações na excreção de metabólitos secundários após 350 gerações (McBryde et al., 2006).

Mudanças ambientais podem reduzir grupos de leveduras em uma população mista e isso parece acontecer sempre que as velocidades das mudanças ambientais excedem a capacidade de populações diferentes persistirem e/ou manterem graus significativos de dominância durante o processo (Bell; Gonzales, 2011). As mutações dependem do tipo e grau de estresse, bem como do grau de adaptação das células de leveduras. Parece que a evolução dinâmica afeta tanto a persistência quanto a diversidade de espécies que surgem em ambientes desfavoráveis. Em condições de estresse, mutações benéficas podem ocorrer para minimizar os efeitos das condições adversas do ambiente (ibidem). Usando-se a técnica do PCR-*fingerprinting*, isolados obtidos durante a operação do processo, ao longo de meses de fermentação do melaço, foram identificados como variantes genéticos que dominaram a população de leveduras por terem adquirido um nível mais elevado de adaptação ao processo (Da Silva Filho et al., 2005).

A teoria da renovação genômica foi proposta para explicar os aumentos na diversidade de linhagens de levedura que surgem durante o processo de fermentação, sendo estes aumentos atribuídos à evolução dinâmica da população de leveduras. A diversidade populacional depende da proporção dos microrganismos, da conversão de heterozigoto em homozigoto e da formação de haploides que dão origem a híbridos intra- e interespecíficos (Mortimer, 2000). Uma levedura híbrida foi inoculada em um fermentador contínuo de cinco estágios operando em temperaturas crescentes (Souza et al., 2007a). Os seguintes tipos de isolados foram obtidos deste sistema quando o mesmo encontrava-se em operação na faixa de 39°C a 47°C:

- isolados haploides com ou sem marcas de auxotrofia da levedura *starter* ou marcas de auxotrofia novas;
- isolados, mostrando reações de cruzamento positivas ou negativas (*mating type*), com ou sem marcas de auxotrofia da levedura híbrida usada como inóculo. As características genéticas destes isolados indicam a ocorrência da renovação genômica induzida por temperaturas altas neste tipo de sistema de fermentação. Por outro lado, a utilização de uma levedura, cujo caráter *killer* foi codificado por dois genes dominantes localizados em cromossomos diferentes, foi usada como *starter* e dominou no mosto de uva até o final da fermentação (Goto et al., 1992).

Populações microbianas diferentes desenvolvem-se ao longo de fermentações abertas industriais. Os métodos moleculares de acompanhamento da dinâmica populacional são dispendiosos, requerem tempos longos e técnicos especializados, mesmo quando a técnica da PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) é usada (Ivey; Phister, 2011). Os métodos moleculares diretos (análise dos ácidos nucleicos totais das amostras) são recomendados para identificação do perfil das populações mistas. No entanto, as técnicas diretas são mais rápidas e podem identificar organismos em nível de gênero e, eventualmente, em nível de espécie (ibidem). Os métodos diretos (identificação de colônias isoladas) parecem interessantes para a identificação de espécies de leveduras em populações mistas.

## Os estados fisiológicos e a atividade fermentativa das leveduras

O conceito de estado fisiológico em fermentação foi definido por Konstantinov e Yoshida (1989), como uma característica fisiológica de uma população de células decorrente de mudanças ocorridas nas condições de cultivo. Em cultivos em batelada ou contínuos, o estado fisiológico da população de células não é uma característica constante e deve refletir mudanças esperadas e não esperadas no comportamento da planta industrial, tal que pequenas alterações na estratégia do processo possam contornar os eventuais problemas. A caracterização do estado fisiológico das células dos microrganismos deveria ser mais bem explorada em biotecnologia, uma vez

que a velocidade e eficiência dos processos dependem do estado fisiológico das células. Variáveis intracelulares como concentrações de NADH, ATP, nível de enzimas chaves das vias metabólicas e metabolitos estão relacionados com as atividades de crescimento e formação de produtos e poderiam ser usados como indicadores de estados fisiológicos. Dessa forma, medidas desses indicadores poderiam ser usadas como uma forma de diagnóstico sobre o andamento do processo, tal que ações preventivas pudessem ser tomadas para evitar perdas durante o processo de produção do etanol.

### **As oscilações em estados fisiológicos das células**

Durante fermentações destinadas à produção de etanol combustível em bateladas alimentadas sucessivas, a levedura fica exposta a estresses sucessivos diversos, sobretudo em escala industrial. Assim, o estado fisiológico do fermento varia entre ciclos de fermentação. A levedura também fica exposta a estresses durante as paradas do processo que ocorrem nas destilarias, sobretudo por problemas relacionados com o corte e transporte da cana-de-açúcar em períodos de chuva contínua. É desejável que o estado fisiológico das células possa ser mantido de forma econômica e eficiente. Para tal, é necessário que se disponha de métodos de avaliação da vitalidade ou atividade metabólica antes do uso do fermento, bem como definir formas de condicionar o fermento, tal que as células possam desenvolver resistência a essas formas de estresses. Diversos eventos ocorrem durante a interrupção da atividade fermentativa, causando as seguintes alterações (Gabier et al., 2005):

- na capacidade de cultivo (“*cultivability*”);
- na viabilidade (indicativa da capacidade de reoxidar o NADH) que diminui, embora lentamente, com as perdas em trealose;
- a vitalidade ou a atividade metabólica reduz a capacidade de crescimento e o teor de trealose;;
- no potencial de membrana, pois a despolarização da membrana causa quedas no pH intracelular e prejuízo no cultivo das células;
- no pH intracelular;
- na quantidade de produtos inibitórios produzidos (por exemplo, etanol, acetaldeído, ácido acético);
- no estágio das células no ciclo de divisão celular.

Células de levedura em fase *lag* ou estacionária apresentam limitações quanto ao crescimento, enquanto que em fase logarítmica a predominância das atividades de crescimento ou fermentação depende da densidade das células no processo e da aeração (efeitos Pasteur e Crabtree).

### **Estágio das células da levedura no ciclo de divisão celular e atividade de crescimento**

As características das células variam com o estágio do ciclo de divisão celular. Parte das células da população de leveduras pode não apresentar brotos em fase logarítmica. Na ausência de brotos, as células apresentam maiores resistências ao choque térmico, níveis de transcrição e tradução reduzidos e maior resistência a diversos estresses (Plesset et al., 1987).

Muitos microrganismos sobrevivem em fase estacionária induzida por ambientes pobres em nutrientes. Conforme já descrito (Werner-Washburne et al., 1993), células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fase estacionária são fisiológica e bioquimicamente distintas de células em fase exponencial. Na fase estacionária, a parede celular torna-se mais rígida, menos porosa, enquanto as mitocôndrias estão em maior número e são mais arredondadas. Ao aproximarem-se da fase estacionária, as células passam a sintetizar proteases (Jones, 1984) que se acumulam em várias inclusões celulares, enquanto carboidratos de reserva, como glicogênio e trealose, se acumulam no citoplasma. Outra característica das células em fase estacionária consiste na capacidade de estas sobreviverem por longos períodos em água sem adição de nutriente. A fase estacionária é caracterizada por diminuição da velocidade de crescimento e diminuição progressiva na síntese de proteínas (diminuição de até 95%), bem como acúmulo de RNAs (Boucheirie, 1985) e, por fim, o ciclo celular é totalmente interrompido.

O crescimento é afetado por condições de operação do processo (temperatura, pH) e por propriedades intrínsecas, tais como o tipo de linhagem, meio de cultura, estado fisiológico do inóculo e *design* do processo. Os parâmetros relacionados com as diferenças em estado fisiológico do inóculo são independentes do tipo de linhagem e meios de cultura utilizados (Di Serio et al., 2003). O aumento do volume das células e a proliferação são processos altamente regulados, e perdas em atividade de regulação causam a inviabilidade celular (Granot; Snyder, 1991).

O controle da atividade da levedura (crescimento e fermentação em produção de etanol combustível) e sua viabilidade são parâmetros críticos na otimização de um processo industrial. Os microrganismos adaptam-se aos diversos ambientes para sobreviver e multiplicar-se. No entanto, poucos estudos descrevem a adaptação da levedura ou recuperação da atividade fermentativa e crescimento frente a estresses físicos e químicos durante a fermentação (Sanchez-Gonzales et al., 2009).

### **Variações em síntese de proteínas**

A síntese de proteína ocorre durante o ciclo de divisão celular e crescimento das células filhas ou brotos. Na fase *lag*, o metabolismo celular está ativado para a progressão no ciclo, passando pelas fases S e G<sub>2</sub>, fase mitótica e, por fim, a formação da célula broto. A velocidade de síntese de proteínas aumenta muito rapidamente (20 minutos) quando as células do *Saccharomyces cerevisiae* estão em fase *lag* (Brejning; Jespersen, 2002). Neste período de síntese intensa de proteínas, os brotos são liberados das células. Como descrito por esses autores, a velocidade de síntese de proteínas também aumenta quando as células são transferidas de um meio pobre para um meio rico, sendo isso acompanhado por aumento das proteínas totais, sobretudo as proteínas ribossomais. O acompanhamento da expressão de proteínas induzidas na fase *lag* poderia ser útil no controle e otimização de fermentações industriais.

### **Variações em níveis de trealose**

Glicogênio e trealose estão relacionados com o aumento da viabilidade e vitalidade por serem fontes intracelulares de energia. A manutenção de funções celulares essenciais e a sobrevivência das células durante a estocagem dependem do nível de trealose interna (François; Parrou, 2001). A perda de viabilidade está relacionada com o decréscimo da reserva de carboidratos das células, e a queda em teores de trealose induz deterioração no processo de polarização da membrana. Estudos anteriores mostraram que a retenção de um nível alto de trealose durante a fermentação não evita as perdas na capacidade fermentativa, quando a levedura é utilizada para



fermentar massas congeladas de pães. Isso indica que o início da fermentação desencadeia uma rápida mobilização da trealose com consequente diminuição da resistência a estresses, mesmo quando os teores iniciais de trealose são altos (Van Dijck et al., 1995). Quando as células perdem a polaridade, o pH interno cai e a viabilidade diminui lentamente (Gabier et al., 2005). A trealose também atua como um protetor contra o estresse oxidativo produzido durante o processo fermentativo (Saharan; Sharma, 2010). A mobilização da trealose é observada quando as células em fase estacionária passam a se multiplicar com mudanças na atividade das enzimas essenciais, tais como glutatona redutase que está envolvida com a sobrevivência e recuperação das células frente a estresses (Sebollela et al., 2004). A atividade destas enzimas é praticamente abolida a 40°C, uma temperatura que induz resposta fisiológica para acúmulo de trealose. A inibição da glutatona redutase pela trealose aumenta em presença de etanol, indicando que a atividade enzimática é drasticamente afetada pelo etanol. A inibição enzimática pode ocorrer mesmo após um estresse, caso a trealose acumulada não seja prontamente degradada (ibidem). Um estudo recente mostrou que as leveduras selvagens acumulam menos trealose do que as comerciais (Barrajón et al., 2011).

### **Variações em níveis de glicerol**

O glicerol é sintetizado em resposta a diversas situações de estresse. A síntese do glicerol depende de vários fatores, tais como a linhagem selecionada, quantidades de células no inóculo, concentração de íons bissulfito presente no mosto, concentração de açúcares, estresse osmótico, tipo de fonte de nitrogênio e sua concentração, pH e condições de aeração (Ough et al., 1972; Gardner et al., 1993; Albers et al., 1996; Ribéreau-Gayon et al., 2000; Carrasco et al., 2001; Torija et al., 2002). No entanto, quantidades pequenas de dióxido de enxofre ou SO<sub>2</sub> (100 ppm) diminuem significativamente a síntese de glicerol (Rankine; Bridson, 1971). O acúmulo de glicerol interno está inversamente correlacionado com a temperatura de fermentação na fabricação de vinhos. As células que não conseguem sintetizar ou reter glicerol interno fermentam lentamente ou deixam de fermentar em baixas temperaturas.

Durante o crescimento anaeróbico, o NADH formado não pode ser oxidado pelo oxigênio, sendo reoxidado via formação de glicerol. O acúmulo de glicerol é causado pela necessidade de as células manterem um balanço redox favorável (Berovic et al., 2007). As interações das linhagens de levedura entre si, a temperatura e a agitação também afetam a produção de glicerol (Remize et al., 2000). Portanto, o glicerol interno, além de atuar como um protetor osmótico, também contribui com a manutenção do balanço redox das células, em caso de estresse osmótico. A produção elevada de glicerol está relacionada com o aumento na expressão de duas isoformas da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase Gpd1p e Gpd2p (Pigeau; Inglis, 2005).

### Variações em níveis de acetaldeído e acetato

É bem conhecido que o acúmulo de produtos inibitórios durante a fermentação tais como etanol, ácido acético e acetaldeído afetam o crescimento e a viabilidade, bem como a estrutura e função das membranas celulares que, por sua vez, regulam o transporte de nutrientes. O acetaldeído é altamente reativo e biologicamente tóxico além de ser muito polar e isso pode causar estresse aquoso (Hallsworth, 1998). A produção de acetaldeído varia nas diferentes linhagens de levedura, na faixa de 0,5 mg L<sup>-1</sup> a 700 mg L<sup>-1</sup> (Liu; Pillone, 2000).

A adaptação a um meio acidificado com ácido acético protege as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* contra a morte celular programada ou apoptose induzida por este ácido (Giannattasio et al., 2005). Além disso, a formação de aldeídos e ácido acético diminui com a elevação na quantidade do inóculo em fermentações realizadas na presença de concentrações altas de açúcar (Arshad et al., 2008). Em mostos fermentados de vinho, as concentrações de acetaldeído variam normalmente entre 0,3 g.L<sup>-1</sup> a 0,4 g.L<sup>-1</sup> (Martinez et al., 1997). Concentrações altas de acetaldeído adicionado ( $\geq 400\text{mg L}^{-1}$ ) reduzem a duração da fase *lag* e a velocidade específica de crescimento (Stanley et al., 1997). Por outro lado, em concentrações menores de acetaldeído ( $\leq 580\text{mg L}^{-1}$ ), a fase *lag* e a velocidade específica de crescimento aumentaram tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas, mas somente em presença de 3% a 6% de etanol (idem, 1993). Por fim, sugere-se que o acetaldeído inicialmente produzido poderia ser utilizado como um marcador da atividade fermentativa em processos industriais, uma vez que varia com a linhagem da levedura (Cheraiti et al., 2010).

## O bissulfito: preservativo químico

Outros produtos inibitórios estão presentes no melão a ser fermentado. Um deles é o bissulfito de sódio que é usado como agente antioxidante e também como antimicrobiano na fabricação de vinhos penetrando nas células de levedura por difusão simples. No entanto, o bissulfito é formado em pequenas quantidades pelas células de levedura a partir do ânion sulfato, sendo um precursor da síntese de aminoácidos sulfurados. Dentro das células, o dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) é dissociado em  $\text{SO}_3^{2-}$  e  $\text{HSO}_3^-$ , causando redução no pH intracelular e conseqüentemente perda de viabilidade (Walker, 1998). Embora *S. cerevisiae* tolere níveis mais altos de sulfito (2,0% a 3,1% em p/v) do que as bactérias e leveduras selvagens, níveis elevados causam fermentações lentas (*sluggish*) e até a interrupção prematura da fermentação (*stuck fermentations*) como já descrito (Boulton, 1996; Freeman; Donald, 1957).

## Os efeitos tóxicos do etanol produzido

Concentrações de etanol acima de 4%-6% (v/v) podem afetar seriamente os processos celulares. Entre as estratégias usadas para aumentar a sobrevivência das células na presença de altas concentrações de etanol estão a indução de alterações na composição e fluidez (ex., aumento nos níveis de ácidos graxos, aminoácidos e ergosterol) das membranas, bem como o aumento da expressão de proteínas de choque térmico (Ding et al., 2009). Na verdade, o efeito inibitório do etanol e de outros produtos metabólicos torna-se evidente durante ciclos sucessivos de fermentação com reutilização de células, ao longo dos quais ocorre o acúmulo intracelular e gradual dos subprodutos tóxicos nas células (Marques; Serra, 2004).

## Variações nos níveis das espécies reativas do oxigênio molecular

É bem conhecido que as mitocôndrias geram espécies reativas do oxigênio molecular (ROS) durante a respiração celular. Estas espécies reativas são degradadas pelo sistema enzimático de defesa das mitocôndrias à

medida que são formadas. Temperaturas elevadas estimulam o acúmulo de espécies reativas do oxigênio na mitocôndria das leveduras (Davidson; Schiestl, 2001). A expressão de genes que codificam enzimas que destroem peróxidos (superóxido dismutase e catalase) foram observados em leveduras (Zhang et al., 2003). Radicais livres também são gerados durante congelamento e degelo das células de levedura (Park et al., 1998).

## **Nutrientes e seus efeitos sobre atividade fisiológica das células**

Para manter as atividades fisiológicas em um nível favorável, as células das leveduras necessitam de uma fonte de carbono, prótons dissociados no meio (pH baixo), oxigênio, nitrogênio (sal de amônia, ureia, aminoácidos), fósforo, potássio, magnésio, fonte de enxofre, cátions inorgânicos e fatores de crescimento (como as vitaminas exigidas em níveis de  $\mu$ moles) (Walker, 1998; Walker, 2004). Embora a matéria-prima comercial seja rica em nutrientes necessários ao crescimento das leveduras, suplementações nutricionais com fosfato e nitrogênio são necessárias para aumentar o acúmulo de biomassa e produção de etanol. As necessidades de suplementação nutricional dependem da linhagem de levedura, número de células presentes no inóculo e a composição da matéria-prima (Arshad et al., 2008; Mukhtar et al., 2010). O catabolismo das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é muito mais preservado durante a privação de uma fonte de carbono do que uma fonte de nitrogênio (Nilsson et al., 2001). Assim, altos níveis de fontes de carbono associados a baixos níveis de fontes de nitrogênio são as causas mais comuns do desempenho pobre das fermentações (Pretorius, 2000).

## **Exigências por fontes de nitrogênio e fosfato**

Nitrogênio e fósforo constituem as principais exigências nutricionais para o crescimento e eficiência da produção de etanol, pois estão presentes nos ácidos nucleicos e fosfolipídios. A suplementação com DAP (di-amônio-fosfato) tem sido usada como fontes de fosfato e nitrogênio. A

suplementação com DAP apresenta um ótimo entre 32 a 54 ppm dependendo da matéria-prima. Em concentração ótima de DAP, a quantidade de ácido acético produzido diminui com ganhos em rendimentos de etanol (Mukhtar et al., 2010). Por outro lado, quando o DAP é adicionado ao me-lão em concentrações maiores que 150 ppm, a ureia reduz a formação de etanol (ibidem).

Quando as células são submetidas ao estresse osmótico, alguns aminoácidos (histidina, leucina, lisina, arginina, alanina, aspártico, triptofano) intracelulares diminuem nas primeiras horas de fase logarítmica em meio contendo  $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose. Isso sugere que a adição de aminoácidos induz a síntese de proteínas em altas concentrações de açúcar no meio. Na fase estacionária, a disponibilidade de aminoácidos internos diminui ainda mais em função da falta de nutrientes (Pham; Wright, 2008). A elevação nos níveis de viabilidade e proliferação celular, bem como a ativação da via glicolítica podem ser conseguidas com a suplementação do meio com um coquetel de aminoácidos (Pham; Wright, 2008).

Em condição de exaustão da fonte de carbono, a maior perda das células consiste na redução do nível de energia disponível (Thomsson et al., 2003). A falta da fonte de carbono reduz o *pool* de ATP das células a valores inferiores a  $0,1\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ , enquanto as células em estado de jejum por falta de nitrogênio apresentam um *pool* de ATP elevado a  $6\ \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ . Adição de pequenas concentrações de glicose ( $0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para  $1,0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de células iniciais) a uma cultura, no início do estado de jejum ou mesmo em sua fase estacionária mais avançada, permite às células preservarem sua atividade fermentativa. A adaptação ao estado de jejum nutricional pode ser conseguida por meio de uma diminuição gradual de nutrientes (ibidem).

## A adaptação ao etanol produzido

As células da levedura *S. cerevisiae*, adaptadas ao crescimento em meios contendo concentrações crescentes de etanol, não perdem atividade de crescimento em um meio contendo uma concentração alta de etanol (Dinh et al., 2008). No entanto, o teor de lipídios das membranas dessas células adaptadas bem como seus volumes (células maiores) são diferentes das células não adaptadas. Isso sugere que a adaptação ao etanol está relacionada com o ciclo de divisão celular.

## Necessidades de cátions inorgânicos

As necessidades nutricionais das leveduras por minerais são bastante conhecidas e foram extensivamente revisadas. O papel dos minerais está descrito em detalhes abaixo (Walker, 1998; Walker, 2004).

**Potássio:** constitui 1% a 12% da massa seca da levedura. O potássio atua como o cofator principal de enzimas envolvidas com a fosforilação oxidativa, síntese de proteínas e catabolismo de hidratos de carbono.

**Sódio:** concentrações elevadas de íons de sódio são prejudiciais às funções celulares, mas as células dispõem de mecanismos de extrusão de cátions.

**Cálcio:** este cátion desempenha um papel fundamental como mensageiro secundário na transmissão de estímulos externos em células de eucariotos. Além disso, o cálcio se liga à parede das células participando da floculação e apresentando uma ação antagonista quanto ao consumo de magnésio, bloqueando processos metabólicos essenciais. No entanto, quando utilizado em quantidades apropriadas ( $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  a  $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), ocorrem aumentos na velocidade da fermentação e do crescimento da célula. O cálcio está relacionado com o aumento da atividade da ATPase das membranas e níveis de proteína (Li et al., 2010).

**Magnésio:** é o metal mais abundante das células dos seres vivos, sendo essencial para a multiplicação celular. Constitui 0,3% da célula viva em peso seco e atua como um cofator essencial para cerca de 300 enzimas envolvidas com as vias metabólicas. Apesar de sua importância, o conhecimento das funções deste íon e da regulação dos seus transportadores ainda é limitado em *Saccharomyces cerevisiae* (Pisat et al., 2009).

**Zinco:** estes íons podem ser tóxicos, pois afetam a permeabilidade das membranas quanto a entrada de potássio, causando diminuição na atividade de fermentação. Em concentrações de zinco acima de  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , a concentração de etanol produzido diminui (Tosun; Ergun, 2007). São necessários aproximadamente  $7 \times 10^8$  átomos de zinco/células para o crescimento ótimo (Simm et al., 2007). Nas células crescidas em meio contendo zinco, este metal se acumula nos vacúolos por muitas divisões celulares consecutivas, mesmo quando o meio passa a se tornar pobre em relação a este íon (ibidem).

**Níquel:** este cátion não é um nutriente essencial, mas pode se acumular nas células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Porém, o crescimento e os teores de proteína interna diminuem quando a concentração de níquel no meio for superior a  $20 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Neelam; Sood, 2008).

## Interações entre leveduras

A grande diversidade de microrganismos e de suas atividades metabólicas são as razões de os microrganismos estarem envolvidos em tantos processos industriais. A compreensão dos efeitos das interações entre os microrganismos é essencial para o melhoramento de um processo industrial. A convivência de leveduras diferentes em culturas mistas depende dos seguintes fatores (De Almeida, 2011):

- interação entre elas (gênero e espécie);
- condições de fermentação (tipo de processo, alimentação, temperatura, aeração);
- seu genoma e sua atividade metabólica;
- resistência a estresses (térmico, alcoólico);
- falta de nutrientes e presença de inibidores.

As interações entre os organismos podem ser do tipo:

- predador/presa;
- competição;
- inquilinismo;
- simbiose;
- neutralismo;
- comensalismo;
- protocooperação;
- amensalismo ou antagonismo.

## Fatores determinantes da convivência entre leveduras

Diferentes espécies de leveduras provenientes da matéria-prima e/ou do próprio ambiente podem ser encontradas em um processo de fermentação. As variações em disponibilidade de oxigênio, temperatura e níveis de etanol produzido, bem como a acidez são fatores ambientais que determinam variações nas proporções das leveduras nos diferentes estágios do processo. As leveduras do gênero *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, *Dekeae* e *Schizosaccharomyces*, podem sobreviver juntamente com a levedura *Saccharomyces* no mesmo ambiente

por serem tolerantes ao etanol (Fleet; Heard, 1993). Leveduras do gênero *Hansenospora*, *Candida*, *Picchia* e *Metschnikowia* predominam no início do mesmo processo de fermentação, mas logo deixam de predominar em função da capacidade de propagação maior da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações espontâneas (ibidem).

As leveduras não *Saccharomyces* são, em geral, menos tolerantes a baixas concentrações de oxigênio. A multiplicação celular com consumo de oxigênio pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos primeiros estágios da fermentação pode contribuir para letalidade precoce das leveduras selvagens (Fleet, 2003).

A maioria de leveduras não *Saccharomyces* não tolera concentrações de etanol superiores a 5-7% (v/v) e isso explica o fato de perderem viabilidade quando a fermentação prossegue atingindo concentrações superiores de etanol (Heard; Fleet, 1988). No entanto, leveduras como *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Candida cruzei*, *Candida pulcherima* e *Hansenula anomal* têm sido encontradas em mosto de uva contendo até 15% (v/v) de etanol na faixa de 10°C a 15°C, mas reduções na viabilidade ocorrem quando a temperatura eleva-se a 30°C (Gao; Fleet, 1988; Heard; Fleet, 1988). Em fermentações a baixas temperaturas, algumas leveduras não *Saccharomyces* não perdem viabilidade quando o número de células permanece alto até o final do processo (Heard; Fleet, 1988).

Alguns estudos têm demonstrado que as linhagens comerciais competem com as selvagens, mas sem eliminá-las completamente e que a escolha da levedura *starter* gera populações diferenciadas de leveduras selvagens no meio (Egli et al., 1998). Em baixas temperaturas, algumas espécies de leveduras não *Saccharomyces* persistem no processo em proporção significativa durante a fermentação (Heard; Fleet, 1988). Na verdade, a competição entre leveduras depende das linhagens, das condições de implantação do processo e da matéria-prima utilizada, dependendo da presença de contaminantes e da disponibilidade de nutrientes. O uso de leveduras selecionadas seria bastante beneficiado com o desenvolvimento de técnicas genéticas e fisiológicas que pudessem claramente identificar os graus de dominância e permanência de leveduras diferentes e seus desempenhos fermentativos na população microbiana. Isso possibilitaria o monitoramento do processo fermentativo em condições industriais e realização de intervenções quando necessárias.



## Interações metabólicas entre leveduras

Os metabolitos excretados pelas leveduras parecem ser os principais determinantes das interações entre microrganismos, quer seja pelo aumento na concentração de um determinado produto (por exemplo, glicerol externo, acetaldeído e etanol) ou assimilação do produto de um microrganismo por outros como é o caso da assimilação e metabolização de ácidos orgânicos fracos. Interações podem ocorrer entre diversos tipos de levedura ou entre bactérias e leveduras (Fleet, 2008). As interações mais conhecidas entre leveduras são aquelas relacionadas com a diminuição ou aumento de acidez, aumentos em glicerol externo e modulação de sabores em bebidas fermentadas (ibidem). A interação entre *Turulaspora delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* reduz a acidez volátil e os níveis de acetaldeído em vinhos (Bely et al., 2008). Já a levedura *Schizosaccharomyces pombe* reduz a acidez málica em culturas mistas quando convive com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Snow; Gallander, 1979). Em culturas mistas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Issatchenkia orientalis*, a diminuição da acidez málica também foi observada. Concentrações de 15-16 mg.mL<sup>-1</sup> de ácido málico podem ser detectadas em mosto de uva (Kim et al., 2008). O aumento do glicerol foi observado em coculturas de *Candida cantarelli* e *Saccharomyces cerevisiae* (Toro; Vazquez, 2002).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* têm sido usadas como *starters* na produção de *tchapalo*, um tipo de cerveja produzida a partir de mosto de sorgo, em cuja fermentação as duas leveduras interagem por meio de sinergismo (N'Guessan et al., 2010). A cultura pura de *S. cerevisiae* produziu menos etanol que a cultura mista (1 parte de *Saccharomyces cerevisiae*: 2 partes de *Candida tropicalis*) em fermentação a 35°C para a produção de *tchapalo*. Isso indica que ocorreu um sinergismo entre as duas leveduras em relação à produção de etanol. Interações entre bactérias e *Saccharomyces cerevisiae* também ocorrem em fermentações abertas ou realizadas em ambientes não esterilizados (Temudo; Mato, 2009).

Em uma cocultura de *Lactobacillus kefirifaciens* e *S. cerevisiae*, as células de levedura consomem ácido láctico, reduzindo sua concentração, enquanto a velocidade de produção do *kefir* pelo *Lactobacillus kefirifaciens* aumenta (Cheirsilp et al., 2003). Este polissacarídeo, constituído por unidades de galactose e glicose, tem sido empregado como espessante, estabi-

lizante, emulsificante e, em função de sua atividade antitumoral, tem sido utilizado no combate a tumores. A quantidade de polissacarídeo secretado é maior em cultura mista indicando que o *Saccharomyces cerevisiae* estimula o crescimento da bactéria e a produção do polissacarídeo. Assim, durante a formação de *kefir* um sinergismo em relação ao crescimento tem sido observado.

As interações metabólicas entre leveduras em fabricação de etanol combustível são pouco conhecidas. Efeito sinérgico da temperatura e do etanol produzido (Aldiguier et al., 2004), bem como o sinergismo entre o pH e componentes do meio (por exemplo, sulfito e ácido láctico) com efeitos sobre a produção de etanol estão descritos na literatura. No entanto, as interações entre linhagens diferentes de levedura durante a produção de etanol combustível são ainda pouco conhecidas (Dorta et al., 2006).

Numa cocultura de *Saccharomyces uvarum* e uma linhagem híbrida natural (híbrido entre segregantes do *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*, proporção 1:1 no inóculo) observou-se alterações na velocidade específica da produção de etanol, biomassa e formação de acetaldeído, quando comparadas com os dados obtidos em monoculturas (Cheraiti et al., 2005). A cultura pura da levedura híbrida *Saccharomyces uvarum* produziu uma maior quantidade de acetaldeído e tudo indica que a associação entre o acetaldeído produzido pelas duas leveduras pode ter causado um aumento na velocidade específica da produção de etanol como observado na cultura mista. Apesar de tóxico, um nível baixo de acetaldeído estimula o crescimento de leveduras com redução da fase logarítmica de crescimento (Stanley et al., 1993). Em outra cultura mista contendo *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* em meio sintético (Favale et al., 2007), o *Saccharomyces uvarum* tornou-se dominante na população de células em função de seu maior grau de multiplicação, bem como a excreção de níveis superiores de metabolitos secundários (por exemplo, glicerol e acetato). Os níveis de ácido pirúvico excretados também são uma característica da linhagem de levedura e podem dar informações que indicam o andamento do processo. Em produção de vinho, o nível de pirúvico alcança seu valor máximo no início da fermentação, enquanto o acetaldeído aumenta durante todo tempo e atinge seu valor máximo no final do processo fermentativo (Morata et al., 2003).

## Inibição da atividade das células de levedura e seus mecanismos de defesa em hidrolisados de materiais celulósicos

Os hidrolisados lignocelulósicos contêm uma grande variedade de compostos tóxicos constituídos por ácidos orgânicos fracos, aldeídos furânicos e compostos fenólicos que exercem efeitos negativos sobre o metabolismo relacionado com o crescimento e a fermentação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Almeida et al., 2007).

Estratégias baseadas em adaptação (modulação da expressão gênica) podem ser utilizadas para aumentar a tolerância aos inibidores (Parawira; Tekere, 2011; Almeida et al., 2009). Uma estratégia simples de adaptação seria a exposição das células de levedura a concentrações crescentes de inibidores em processo de batelada alimentada ou em processo contínuo. Nestas condições, a produção de enzimas capazes de metabolizar os inibidores se eleva com diminuição da fase *lag* (Heer; Sauer, 2008).

O ácido acético é o ácido orgânico fraco mais abundante em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, sendo este também um subproduto da fermentação alcoólica em baixas concentrações de açúcar (Almeida et al., 2007). O efeito inibitório deste ácido sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser reduzido pelo aumento do pH do meio. O ácido fórmico é um agente inibitório de maior efeito sobre a levedura do que o ácido acético, pois apresenta um pKa menor que o do ácido acético (Almeida et al., 2007) e induz apoptose (Du et al., 2008).

Os derivados furânicos resultantes de uma reação de desidratação das hexoses e pentoses (Almeida et al., 2009) induzem apoptose (Perrone et al., 2008). A redução dos níveis dos inibidores (derivados de hexoses e pentoses) resulta da formação dos respectivos álcoois pela própria levedura, como uma resposta de defesa das células (Heer et al., 2009).

Os compostos aromáticos derivados da lignina afetam o crescimento e a fermentação, sendo seus efeitos inibitórios dependentes das estruturas dos aromáticos (Larsson et al., 2000). A lacase é uma enzima produzida por fungos que reduz a toxicidade dos hidrolisados por transformar o coniferilaldeído no álcool correspondente (ibidem). A vanilina é outro derivado da hidrólise que atua em concentrações muito baixas e seu efeito inibitório está relacionado com o metabolismo do ergosterol (Endo et al., 2008; 2009).

As leveduras contendo teores maiores de ergosterol são mais tolerantes à vanilina.

## Conclusões e perspectivas

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo robusto quanto à sobrevivência em condições de estresses físicos e à capacidade de tolerar o etanol. O uso de altas quantidades de células (*high cell density fermentations*) minimiza os efeitos da evolução populacional e propicia aumentos em rendimento alcoólico em curtos períodos de tempo. Elevações na diversidade dos contaminantes e o aparecimento de variantes fenotípicas são observados durante processos de longa duração com reutilização de células. No entanto, a dinâmica populacional deve ocorrer com uma velocidade inferior ao surgimento de variações populacionais não benéficas ao processo. Leveduras não *Saccharomyces*, vindas junto com a matéria-prima e sua propagação, podem passar a constituir uma parte significativa da população de leveduras que possam ser prejudiciais ao processo. Outro fator que afeta o processo consiste no uso de volumes grandes de trabalho (*large working volumes*) nos biorreatores. Quanto maior o volume do biorreator, mais difícil será a manutenção de temperaturas favoráveis e a homogeneidade da suspensão de células. A falta de homogeneidade leva à formação de gradientes de concentração de nutrientes e de células, os quais afetam tanto a dinâmica populacional quanto os parâmetros cinéticos do processo.

Pouco se sabe sobre as interações que ocorrem entre produtos metabólicos produzidos por leveduras diferentes durante o processo de produção do bioetanol. É fundamental conhecer quais os tipos de interações que contribuem para aumentar o nível de subprodutos que afetam de forma negativa a cinética do processo. Por outro lado, o desenvolvimento de leveduras que expressem genes para a secreção de agentes antibacterianos (lisozima), tolerantes a preservativos químicos (bissulfito) e a metabolitos tóxicos (álcoois, ácido acético, acetaldeído e ácido dodecanoico) são desejáveis (Pretorius, 2000).

Quanto à fermentação de hidrolisados celulósicos, é fundamental o isolamento e/ou desenvolvimento de leveduras capazes de secretar altas quantidades de celulases e que sejam tolerantes aos inibidores resultantes da hidrólise. As enzimas devem ser tolerantes a pHs ácidos e apresentarem boa

atividade de hidrólise na faixa de temperatura de 34°C a 37°C (temperaturas da fermentação alcoólica). Os maiores desafios na produção do etanol celulósico consistem nos altos custos das enzimas comerciais e a necessidade de uma quantidade grande destas enzimas. Assim, pesquisas são necessárias para melhorar o processo de hidrólise enzimática, reduzir tempos de hidrólise e minimizar a inibição por produtos da reação enzimática. Também é importante desenvolver pré-tratamentos para material celulósico que sejam rápidos, eficientes e de baixo custo (Van de Vyver et al., 2011).

## Referências bibliográficas

- ALBERS, E. et al. Influences of the nitrogen sources on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, p.3181-95, 1996.
- ALDIGUIER, A. S. et al. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behavior in ethanol bio-fuel production. *Bioproc. Biosystems. Eng.*, v.26, p.217-22, 2004.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.82, p.340-9, 2007.
- . et al. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.82, p.625-38, 2009.
- ARSHAD, M. et al. Optimization of process variables for minimization of by product formation during fermentation of blackstrap molasses to ethanol at industrial scale. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.47, p.410-14, 2008.
- BARRAJÓN, N. et al. Competition between spontaneous and commercial yeasts in winemaking: study of possible factors involved. In: MÉNDEZ VILAS, A. (Ed.). *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. Badjuz: Formatex, 2010. v.1, p.1035-41.
- . Enological properties in wild and commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: relationship with competition during alcoholic fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.27, p.2703-10, 2011.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.*, v.8, p.1155-63, 2008.
- BELL, G.; GONZALEZ, A. Adaptation and evolutionary rescue in metal populations experiencing environmental deterioration. *Sci.*, v.332, p.1327-9, 2011.
- BELY, M. et al. Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, v.122, p.312-20, 2008.
- BEROVIC, M. et al. Influence of heat shock on glycerol production in alcohol fermentation. *J. Bisc. Bioeng.*, v.103, p.135-9, 2007.

- BETTIGA, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol. Biofuels*, v.1, p.16-23, 2008.
- BETTIGA, M. et al. Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway. *Microb. Cell. Fact.*, v.8, p.40-51, 2009.
- BOUCHERIE, H. Protein synthesis during transition and stationary phases under glucose limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, v.161, p.385-92, 1985.
- BOULTON, B. Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In: BOULTON, B. et al. *Principles and Practices of Winemaking*. New York: Chapman & Hall, 1996. p.139-72, 1996.
- BREJNING, J.; JESPERSEN, L. Protein expression during lag phase and growth initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.*, v.75, p.27-38, 2002.
- CAPECE, A. et al. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, v.144, p.187-92, 2010.
- CARRASCO, P.; QUEROL, A.; DEL OLMO, M. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch. Microbiol.*, v.175, p.450-7, 2001.
- CHEIRSILP, B. et al. Interactions between *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for kefir production. *J. Biosci. Bioeng.*, v.96, p.279-84, 2003.
- CHERAITI, N.; GUEZENEC, S.; SALMON, J. Redox Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.71, p.255-60, 2005.
- CHERAITI, N.; GUEZENEC, S.; SALMON, J. Very early acetaldehyde production by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains: a new intrinsic character. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.86, p.693-700, 2010.
- CORDERO-BUESO, G. et al. Remanence and survival of commercial yeast in different ecological niches of the vineyard. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v.77, p.429-37, 2011.
- DA SILVA-FILHO, E. A. et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-finger printing. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.88, p.13-23, 2005.
- DAVIDSON, J. F.; SCHIESTL, R. H. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, v.21, p.8483-9, 2001.
- DE ALMEIDA, J. A. F. *Princípios básicos da agroecologia*. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/Artigos/artigo23.htm>>. Acesso em: 14 jun. 2011.
- DI SERIO, M. et al. Quantitative analysis of the key factors affecting yeast growth. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v.42, p.5109-16, 2003.
- DING, J. et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.85, p.253-63, 2009.

- DINH, T. N. et al. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. *PLoS ONE*, v.3, p.1-7, 2008.
- DORTA, C. et al. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.22, p.177-82, 2006.
- DU, L. et al. Formic acid induces Yca1p-independent apoptosis-like cell death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, v.8, p.531-9, 2008.
- EGLI, C. M. et al. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.*, v.85, p.779-89, 1998.
- ENDO, A. et al. Genome-wide screening the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*, v.1, p.3-8, 2008.
- ENDO, A.; NAKAMURA, T.; SHIMA, J. Involvement of ergosterol in tolerance to vanillin, a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.299, p.95-9, 2009.
- FAVALE, S.; PIETROMARCHI, P.; CIOLFI, G. Metabolic activity and interactions between two strains, *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *bayanus* (SBC2) and *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *uvarum* (S6u), in pure and mixed culture fermentations. *Vitis*, v.46, p.39-43, 2007.
- FIECHTER, A.; VON MEYENBURG, K. Automatic analysis of gas exchanges in microbial systems. *Biotechnol. Bioeng.*, v.10, p.535-49, 1968.
- FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, v.86, p.11-22, 2003.
- \_\_\_\_\_. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.*, v.8, p.979-995, 2008.
- FLEET, G. H.; HEARD, G. Yeasts-growth during fermentation. In: FLEET, G. H. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Chur: Harwood Academic Publishers. Cap.2, p.27-54, 1993.
- FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.25, p.125-45, 2001.
- FREEMAN, G. G.; DONALD, G. M. S. Fermentation processes leading to glycerol. II. Studies on the effect of sulfites on viability, growth and fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol.*, v.5, p.211-15, 1957.
- GABIER, A. et al. Intracellular physiological events of the yeast *Rhodotorula glutinis* during storage at +4°C. *Int. J. Food Microbiol.*, v.105, p.97-109, 2005.
- GANCEDO, J. M. The early steps of glucose signaling in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.32, p.673-704, 2008.
- GAO, G. C.; FLEET, G. H. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Microbiol.*, v.65, p.405-9, 1988.
- GARDNER, N.; RODRIGUE, N.; CHAMPAGNE, C. P. Combined effects of sulfites, temperature and agitation time on the production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.59, p.2022-8, 1993.

- GIANNATTASIO, S. et al. Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. *Gene*, v. 354, p.93-8, 2005.
- GOTO, S.; KITANO, K.; SHINOHARA, T. Utilization of KHR killer as genetic marker for purity test of *starter* yeast during fermentation of grape musts. *J. Ferment. Bioeng.*, v.73, p.70-2, 1992.
- GRANOT, D.; SNYDER, M. Glucose induces camp-independent growth-related changes in stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.88, p.5724-8, 1991.
- HALLSWORTH, J. E. Ethanol-induced water stress in yeast. *J. Ferment. Bioeng.*, v.85, p.125-37, 1998.
- HEARD, G. M.; FLEET, G. H. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Microbiol.*, v.65, p.23-8, 1988.
- HEER, D.; SAUER, U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of tolerant yeast strain. *Microb. Biotechnol.*, v.1, p.497-506, 2008.
- HEER, D.; HEINE, D.; SAUER, U. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentration of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxireductases. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.75, p.7631-8, 2009.
- HENSCHKE, P. A. Assessment of active dried yeast and the importance of vitality. *Aust. N. Z. Wine Ind. J.*, v.6, p.291-6, 1991.
- IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v.38, p.1619-34, 2011.
- JONES, E. W. The synthesis and function of proteases in *Saccharomyces*: genetic approaches. *Ann. Rev. Genet.*, v.18, p.233-70, 1984.
- KIM, D.; HONG, Y.; PARK, H. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnol. Lett.*, v.30, p.1633-8, 2008.
- KONSTANTINOV, K.; YOSHIDA, T. Physiological state control of fermentation processes. *Biotechnol. Bioeng.*, v.33, p.1145-56, 1989.
- LALUCE, C. et al. New amylolytic yeast strains for starch and dextrin fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.54, p.2447-51, 1988.
- LARSSON, S. et al. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.84-86, p.617-32, 2000.
- LI, J. et al. Improvement of alcoholic fermentation by calcium ions under enological conditions involves the increment of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.26, p.1181-6, 2010.
- LIU, S. PILLONE, G. J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in wine-making with emphasis on microbiological implications. *Int. J. Food. Sci. Technol.*, v.35, p.49-61, 2000.



- MARQUES, T. A.; SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.24, p.532-5, 2004.
- MARTÍNEZ, P.; PÉREZ RODRÍGUEZ, L.; BENÍTEZ, T. Evolution of flor yeast population during the biological aging of fino sherry wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, v.48, p.160-8, 1997.
- McBRYDE, C. et al. Generation of novel yeast strains by adaptive evolution. *Am. J. Enol. Vitic.*, v.57, p.423-30, 2006.
- MORATA, A. et al. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strain of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with Vitisin A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.*, v.51, p.7402-9, 2003.
- MORTIMER, R. K. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.*, v.10, p.403-9, 2000.
- MUKHTAR, K. et al. Comparative study on two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for optimum ethanol production on industrial scale. *J. Biomed. Biotechnol.*, v.2010, 2010.
- N'GUESSAN, F. K. et al. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* as starter cultures for the alcoholic fermentation of *tchapalo*, a traditional sorghum beer. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.26, p.693-9, 2010.
- NEELAM, K.; SOOD, I. S. Bio-accumulation of Nickel by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Council Chem.*, v.25, p.56-9, 2008.
- NILSSON, A. et al. The catabolic capacity of *Saccharomyces cerevisiae* is preservative to a higher extent during carbon comparative to nitrogen starvation. *Yeast*, v.18, p.1371-81, 2001.
- OUGH, C. S.; FONG, D.; AMERINE, M. A. Glycerol in wine: determination and some factors affecting. *Am. J. Enol. Vitic.*, v.23, p.1-5, 1972.
- PALMIERI, M. C.; GREENHALF, W.; LALUCE, C. Efficient flotation of yeast cells grown in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.*, v.50, p.248-56, 1996.
- PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v.31, p.20-31, 2011.
- PARK, J. et al. The cytoplasmic Cu, Zn, superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress. *J. Biol. Chem.*, v.273, p.22921-8, 1998.
- PERES, M. F. S.; SOUSA, S. R.; LALUCE, C. Obtaining strains of *Saccharomyces* tolerant to high temperatures and ethanol. In: SPENCER, J. F. T.; SPENCER, A. L. R. *Food Microbiology Protocols*. Totowa: Humana Press Inc., 2001. v.14, cap. 40, p.355-67.
- PERRONE, G. G.; TAN, S. X.; DAWES, I. W. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochem. Biophys. Acta*, v.1783, p.1354-68, 2008.
- PHAM, T. K.; WRIGHT, P. C. The proteomic response of *Saccharomyces cerevisiae* in very high glucose conditions with amino acid supplementation. *J. Proteome Res.*, v.7, p.4766-74, 2008.

- PIGEAU, G. M.; INGLIS, D. L. Upregulation of ALD3 and GPD1 in *Saccharomyces cerevisiae* during ice wine fermentation. *J. Appl. Microbiol.*, v.99, p.112-25, 2005.
- PISAT, N. P.; PANDEY, A.; MACDIARMID, C. W. MNR2 regulates intracellular magnesium storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, v.183, p.873-84, 2009.
- PLESSET, J. et al. Effect of cell position on thermo tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, v.169, p.779-84, 1987.
- POWELL, C. D.; DIACETIS, A. N. Long term serial repitching and the genetic and phenotypic stability of brewer's yeast. *J. Inst. Brew.*, v.13, p.67-74, 2007.
- PRETORIUS, I. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, v.1, p.675-729, 2000.
- QUEROL, A. et al. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, p.2948-53, 1992.
- RANKINE, B. C.; BRIDSON, D. A. Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. *Am. J. Enol. Vitic.*, v.22, p.6-12, 1971.
- REMIZE, F.; SABLAYROLLES, J. M.; DEQUIN, S. Re-assessment of the influence of the yeast strains and environmental factors on glycerol production in wine. *J. Appl. Microbiol.*, v.88, p.371-8, 2000.
- RIBÉREAU-GAYON, P. et al. *Handbook of Enology*. The Microbiology of wine and vinifications. West Sussex: Wiley, 2000.
- SAHARAN, R. K.; SHARMA, S. C. Correlation studies of trehalose with oxidative stress in ethanol stressed yeast *Pachysolentannophilus*. *Curr. Res. J. Biological Sci.*, v.2, p.300-5, 2010.
- SANCHEZ-GONZALEZ, Y. et al. Dynamic microbial response under ethanol stress to monitor *Saccharomyces cerevisiae* activity in different initial physiological states. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v.32, p.459-66, 2009.
- SANTAMARÍA, P. et al. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *Int. J. Food Microbiol.*, v.103, p.49-56, 2005.
- SEBOLLELA, A. et al. Inhibition of yeast glutathione reductase by trehalose: possible implications yeast survival and recovery from stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.36, p.900-8, 2004.
- SIMM, C. et al. *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. *Eukaryotic Cell*, v.6, p.1166-77, 2007.
- SNOW, P. G.; GALLANDER, J. F. Deacidification of white table wines through partial fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.*, v.30, p.45-8, 1979.
- SOUSA, S. R.; PERES, M. F. S; LALUCE, C. Flotation assay in small volumes of yeast cultures. In: SPENCER, J. F. T.; SPENCER, A. L. R. *Food Microbiology protocols*. Totowa: Humana Press Inc., 2001. v.14, cap. 39, p.349-54.
- SOUZA, C. S. et al. A strategy to compare yeast strains and improve cell survival in ethanol production processes above 30°C. In: Mendes Vilas, A. (Ed). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Badjoz: Formatex, 2007. v.1, p.410-7.

- SOUZA, C. S. et al. Genetic and physiological alterations occurring in a yeast population continuously propagated at increasing temperatures with cell recycling. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.23, p.1667-77, 2007.
- STANLEY, G. A.; HOBLEY, T. J.; PAMMENT, N. B. Effect of acetaldehyde on *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* subjected to environmental shocks. *Biotechnol. Bioeng.*, v.53, p.71-8, 1997.
- STANLEY, G. A. et al. Inhibition and stimulation of yeast growth by acetaldehyde. *Biotechnol. Lett.*, v.15, p.1199-204, 1993.
- TEMUDO, M. F.; MATO, T. Xylose anaerobic conversion by open-mixed cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.82, p.231-9, 2009.
- THOMSSON, E. et al. Carbon starvation can induce energy deprivation and loss of fermentative capacity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.69, p.3251-57, 2003.
- TORIJA, M. J. et al. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.*, v.80, p.47- 53, 2002.
- TORO, M. E.; VAZQUEZ, F. Fermentation behavior of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.18, p.347-54, 2002.
- TOSUN, A.; ERGUN, M. Use of experimental design method to investigate metal ion effects in yeast fermentations. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.82, p.11-5, 2007.
- VAN DE VYVER, S. et al. Recent advances in the catalytic conversion of cellulose. *Chem. Cat. Chem.*, v.3, p.82-94, 2011.
- VAN DIJCK, P. et al. Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and non fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, p.109-15, 1995.
- WALKER, G. M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. London: John Wiley & Sons, 1998.
- . Metals in yeast fermentation processes. *Adv. Appl. Microbiol.*, v.54, p.197-229, 2004.
- WERNER-WASHBURNE, M. et al. A stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, v.57, p.383-401, 1993.
- YOUNG, E.; LEE, S.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. *Biotechnol. Biofuels*, v.3, p.24-35, 2010.
- ZHANG, L. et al. Growth temperature downshift induces anti-oxidate responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.307, p.308-14, 2003.

## 8

# Produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 utilizando substratos não convencionais como alternativa à produção convencional

*Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ermandes,  
Crispin Humberto Garcia-Cruz<sup>1</sup>*

### Considerações gerais

A crise do petróleo de 1973 gerou grande interesse na busca de recursos energéticos renováveis, assim como em encontrar fontes de recursos orgânicos capazes de substituir os atuais produtos petroquímicos. Até a década de 1970, o etanol no Brasil era apenas um simples subproduto da indústria canavieira, contudo esta situação mudou por completo a partir da crise do petróleo. O governo brasileiro promoveu a busca de uma fonte alternativa de combustível e retomou as pesquisas e os investimentos para o desenvolvimento do álcool como combustível. O grande momento deste período se deu em 1975 com a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Dessa forma, por um lado, realizaram-se esforços para melhorar a rentabilidade dos processos de obtenção de bioálcool, e por outro lado, tratou-se de substituir os processos do tipo químico por outros do tipo biológico. Em função da queda no preço do petróleo no início da década de 1980, estes estudos perderam impulso durante certo tempo; contudo, a consciência de que os combustíveis fósseis vão se esgotar e que é necessário utilizar tecnologias menos poluentes fez renascer o interesse nesses processos biológicos.

Desde aquela data, toda a produção industrial de álcool é realizada utilizando leveduras, como microrganismo da fermentação, e pouco se conhece

---

<sup>1</sup> Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa (Fapesp).

de outros microrganismos que produzam álcool em escala industrial. Em virtude da situação mundial de destaque que se encontra o Brasil no setor energético, algumas instituições vêm selecionando microrganismos eficientes para produção de álcool como alternativa futura.

Nos últimos 15 anos, a bactéria *Zymomonas mobilis* vem despertando muito interesse por seu potencial na produção de etanol, produzindo aproximadamente 1,9 mol de etanol por mol de glicose, com velocidade três a quatro vezes maior que a *Saccharomyces cerevisiae*.

*Zymomonas mobilis* é uma bactéria gram-negativa, que utiliza sacarose, glicose e frutose como fonte de carbono e energia, produzindo quantidades equimolares de etanol e CO<sub>2</sub>. Essa bactéria tem sido alvo de pesquisas por causa de seu alto potencial fermentativo, do qual resulta em uma produção de etanol comparável, ou até mesmo superior, a obtida por leveduras. Segundo a literatura, estudos observaram uma série de vantagens na fermentação com *Zymomonas* em relação à levedura *Saccharomyces*, tradicionalmente utilizada em fermentações etanólicas. Esta bactéria apresenta aproximadamente o dobro de velocidade de crescimento, produz etanol numa velocidade seis a sete vezes maior e o fator de conversão de glicose em etanol é 5% maior.

Ainda que a importância da produção de etanol como energia renovável para o Brasil e geração de empregos seja inegável, a elaboração de meios de cultivo de baixo custo é um fator importante em processos fermentativos industriais. O aproveitamento de subprodutos da indústria do açúcar contendo alta concentração de sacarose como substratos no processo biotecnológico é uma alternativa atrativa e promissora, uma vez que, os substratos utilizados são caros o que inviabiliza o custo do produto final. Isso poderia ser melhorado com a utilização de matérias-primas regionais.

## Revisão bibliográfica

### Histórico da produção e uso de etanol no Brasil

Em 1903, foi proposto pelo 1º Congresso Nacional de Aplicação Industrial do Álcool que se estabelecesse infraestrutura para promover a produção e o uso de álcool; e, de fato, durante a Primeira Guerra Mundial seu uso foi compulsório em muitas áreas do país.

O Brasil, desde a década de 1920, já estudava e testava combustíveis alternativos e renováveis, tais como o álcool de cana-de-açúcar. Um Decreto Federal promulgado em 1931 estabelecia as orientações de transporte e comercialização do etanol e decretava que até 5% (por volume) fosse adicionado à gasolina. Até 1941, a produção de etanol atingiu um patamar de 650 milhões de litros por ano (Campos, 2003; Negrão; Urban, 2005).

A decisão política e econômica envolvendo investimentos adicionais, do uso da cana-de-açúcar para produzir etanol, em adição ao açúcar, foi tomada pelo Governo Federal, com o Proálcool, implementado em escala comercial nos anos 1970 (Moreira; Goldemberg, 1999). Esta decisão foi tomada em 1975, quando a economia brasileira foi bastante afetada pela crise mundial do petróleo ao mesmo tempo que, no mercado internacional, o preço do açúcar declinava rapidamente, tornando atrativa a produção de álcool. Como resposta direta a este abalo econômico, criou-se o programa de incentivo à produção de etanol, com o intuito de futuramente substituir a gasolina por este biocombustível (Goldemberg et al., 2004). Embora o programa mostrasse autossuficiência para sua implementação, a queda nos preços do petróleo faria que o Proálcool passasse por anos de dificuldade. Assim, a perspectiva da produção não só de álcool e açúcar, mas também de explorar ao máximo os subprodutos gerados durante o processo de obtenção do álcool caiu no esquecimento governamental, sendo posteriormente retomada por esforço próprio de usinas e destilarias.

A produção de cana-de-açúcar e álcool no Brasil entre 1975 e 1985 quadruplicou e, o etanol tornou-se o mais importante combustível. Contudo, a dinâmica que sustentava a oferta e consumo brasileiro do etanol carburante continuamente esteve pressionada pela competição dos preços oscilantes do petróleo no mercado internacional e, sobretudo, pela maior atratividade da *commodity* açúcar, o que culminou com a desaceleração do programa na década de 1990 acarretando uma marcante diminuição da frota de carros 100% movidos a álcool e a desestabilização conjuntural do modelo (Negrão; Urban, 2005).

A competitividade estabelecida entre os preços do petróleo e dos óleos vegetais e visando atender às preocupações ambientais existentes, a década de 1990 caracterizou-se pela produção comercial e instalação de plantas de produção de bicombustível em escala industrial (Campos, 2003).

As principais etapas podem ser observadas na Figura 8.1, esta ilustra a evolução dos biocombustíveis no Brasil.

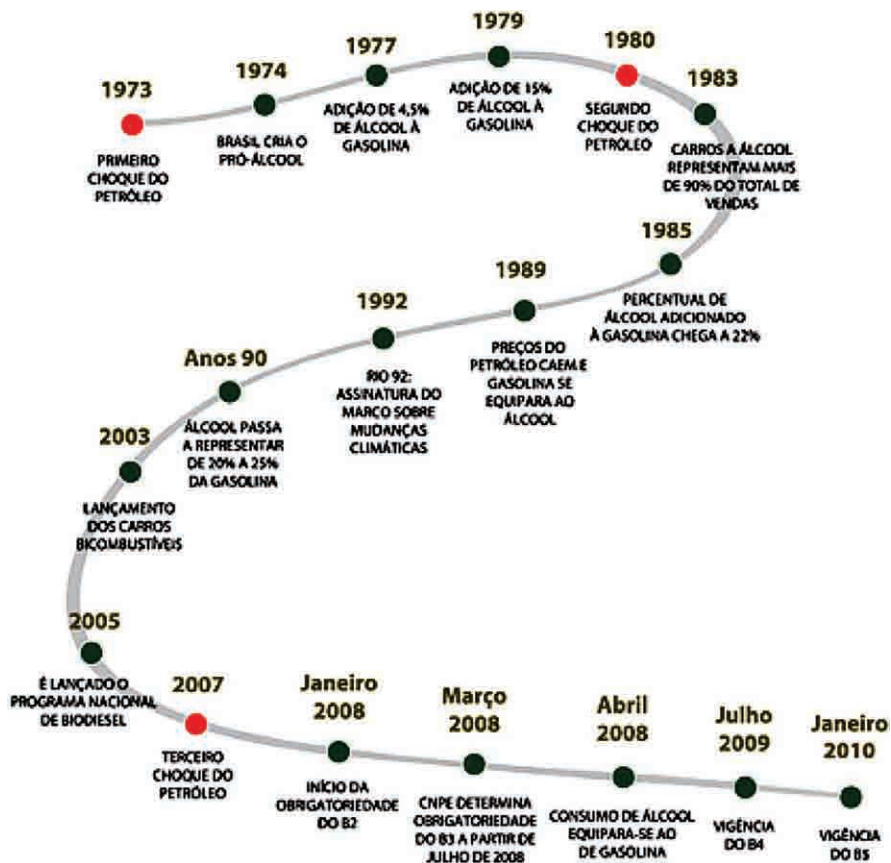


Figura 8.1 – Evolução dos biocombustíveis no Brasil

Fonte: Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, 2010.

Para a União da Agroindústria Canavieira de São Paulo – Única (2010) em seu site, a produção mundial de cana-de-açúcar totaliza quase 1,5 bilhão de toneladas e está localizada predominantemente na faixa tropical do planeta, nos países em desenvolvimento da América Latina, África e Sudeste Asiático. O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar, com 90% na região Centro-Sul e 10% no Nordeste.

Segundo a Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (Anfavea) (2010), a quantidade de vendas internas no atacado por tipo de combustível de veículos automotores, considerando automóveis e comerciais leves, entre nacionais e importados, no ano de 2003 foram (em

unidades): 36,4 mil a álcool, 48,2 mil *flex-fuel*, 1,16 milhões a gasolina e 54,5 mil a diesel, com participação de mercado, respectivamente, iguais a 2,8; 3,7; 89,2 e 4,2%. Em 2009, os números se apresentaram, segundo a Anfavea (2010), em 70 mil unidades a álcool, 2,65 milhões *flex-fuel*, 221,7 mil a gasolina e 3,0 milhões a diesel, com uma participação de 88,2% *flex-fuel*, 7,4% a gasolina e 4,5% a diesel nos comerciais leves.

### **Importância de *Zymomonas mobilis* no contexto histórico da produção de etanol no Brasil**

As leveduras vêm sendo utilizadas pelo homem há pelo menos 8 mil anos e sua manipulação promoveu grande impacto na produção de alimentos, tendo-se o pão, a cerveja, o vinho e o saquê como os produtos mais representativos desses processos milenares de manipulação.

O considerável progresso na área da biotecnologia permite a utilização de técnicas fermentativas já bem estabelecidas, para produção de várias substâncias ou mesmo produtos, tais como: etanol, ácido cítrico, corantes, enzimas e vitaminas entre outros; oriundos da ação de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. O domínio destas técnicas permite a especificidade de ação em relação ao substrato utilizado (Sandes; Di Blasi, 2000).

As leveduras têm representado importante papel como organismo-modelo em estudos bioquímicos, genéticos e de biologia molecular (Torres; Moraes, 2000; Akada, 2002). Cerca de 500 espécies de leveduras são conhecidas pelo homem e, dentre as produtoras de etanol destacam-se, espécies do gênero *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia* e outras. A espécie mais importante de levedura alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*, que possui largo espectro de utilização, sendo empregada na produção de pães, bebidas alcoólicas, etanol e muitos outros produtos.

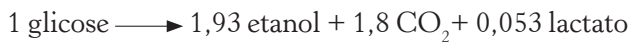
Quanto à tecnologia necessária à produção de álcool, utilizando a cana-de-açúcar e seus resíduos, estudos vêm sendo realizados por pesquisadores para diminuir seu custo econômico de produção, otimizar as condições de bioconversão etanólica, e selecionar os microrganismos com maior produtividade em etanol (Tauk, 1976; Pereira Jr.; Bullock, 1994; Menezes et al., 1998; Venturini-Filho; Cereda, 1998; Cabrini; Gallo, 1999; Ribeiro; Horii, 1999; Dutra et al., 2001; Laluce et al., 2002; Ernandes; Garcia-Cruz, 2011a, b).

Entre as bactérias produtoras de etanol, a espécie *Zymomonas mobilis* apresenta atributos tecnológicos que potencializam seu emprego na fer-



mentação alcoólica em escala industrial, pois possui habilidade de transformar açúcares em etanol e gás carbônico em condições comparáveis às aquelas exigidas pelas leveduras. Sua produtividade de etanol a partir de glicose ultrapassa 97% do valor teórico máximo (Sprenger, 1996).

Gibbs e DeMoss (1954) demonstraram que essa bactéria utiliza, para o catabolismo anaeróbio desses carboidratos, uma modificação da via de Entner-Duodoroff, podendo produzir mais de 1,9 mol de etanol por mol de glicose fermentada e pequena quantidade de lactato, de acordo com a seguinte reação:



Em 1984, Rogers e colaboradores fizeram estudos comparativos entre a bactéria *Zymomonas mobilis* e a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* em relação à produção de etanol. Nestes estudos, os autores observaram uma série de vantagens na fermentação com *Zymomonas* em relação à levedura. Esta bactéria apresenta aproximadamente o dobro de velocidade de crescimento, produz etanol numa velocidade seis a sete vezes maior e o fator de conversão de glicose em etanol é 5% maior. Além disso, a *Zymomonas mobilis* não requer controle adicional de oxigênio para manter sua viabilidade em altas concentrações de células (Rogers et al., 1980).

A capacidade de crescer rapidamente na ausência de oxigênio sugere seu uso em processos contínuos de fermentação para a produção comercial de etanol. Maiores detalhes desses resultados podem ser observados na Tabela 8.1.

Tabela 8.1 – Estudo comparativo entre a bactéria *Zymomonas mobilis* e a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* utilizando meio de cultura com concentração inicial de glicose de 100,0 g/L com relação à produção de etanol

	<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
Tempo de processo (h)	2,51	5,64
$\mu_p$ (h <sup>-1</sup> )	5,44	0,82
$Y_{x/s}$	0,028	0,043
$Y_{p/s}$	0,465	0,460

Velocidade específica de produção de etanol ( $\mu_p$ ), fator de conversão de glicose em células ( $Y_{x/s}$ ) e em etanol ( $Y_{p/s}$ ). Fonte: Rogers e colaboradores (1984).

Segundo Lyness e Doelle (1980), a fermentação quantitativa de glicose, frutose ou sacarose a etanol e dióxido de carbono é considerada uma característica importante do gênero *Zymomonas*. Quando glicose e frutose são utilizadas como fonte de carbono, é obtido rendimento superior a 95% em relação ao rendimento teórico, pois a fermentação produz quase exclusivamente etanol e CO<sub>2</sub>. Quando sacarose, um substrato industrialmente disponível e de baixo custo, é utilizado, o rendimento de etanol representa 75-80% do valor teórico, em função da formação de subprodutos como levana e sorbitol.

## O microrganismo *Zymomonas mobilis*

### Histórico do microrganismo

O uso de microrganismos com a finalidade de obter produtos que venham beneficiar e melhorar o estilo de vida do homem faz parte da civilização desde o início dos tempos. O “aguamiel” (seiva fermentada naturalmente por *Zymomonas mobilis*) foi utilizado pelos astecas na prevenção e no tratamento de infecções intestinais, ainda quando não se conhecia o efeito benéfico dos microrganismos. Em 1911, Barker e Hillier apud Swings e De Ley (1977) foram os primeiros a estudar a bactéria responsável pela deterioração do *flavour* de bebidas fermentadas, sendo a eles atribuída a real descoberta desse gênero. Estes, como não atribuíram um binômio latino ao nome de *Zymomonas mobilis*, em 1928, foi creditada a Lindner apud Swings e De Ley (ibidem) a descoberta dessa bactéria, por ocasião do seu isolamento no México, a partir da seiva fermentada de *Agave atroveriens*, o qual constitui uma bebida regional muito popular chamada “pulque” (Gonçalves de Lima et al., 1970).

Logo após o isolamento da bactéria *Zymomonas mobilis*, em 1931, Lindner, estudando as propriedades antagonistas dessa bactéria verificou, após ingerir o filtrado, ótimos resultados quando o mesmo era utilizado no tratamento de certas infecções entéricas e deu o nome a ela de *Termobacterium mobile* sendo muito semelhante à de Barker e Hillier (Falcão de Morais, 1993). Em 1936, Kluyver e Van Niel reconhecem-na como gênero *Zymomonas*,

considerando uma só espécie *Zymomonas mobilis* com duas subespécies: *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* e a *Zymomonas mobilis* subsp. *pomacii* (Swings; De Ley, 1977, Falcão de Moraes, 1983 a, b).

A década de 1970 caracterizou-se por apresentar diversos esforços no sentido de melhorar e buscar novas fontes para a produção de etanol. Dentro deste contexto, a bactéria *Zymomonas mobilis* revelou-se um microrganismo promissor. Durante a fermentação da sacarose para sua conversão em etanol, no entanto, surgiu como uma das razões do baixo rendimento, um polissacarídeo, a princípio de alto peso molecular, formado a partir da hidrólise da sacarose, denominado então de levana (Jerez, 1993; Ernandes; Garcia-Cruz, 2009, 2011). Segundo Garcia-Cruz (1997), a levana é produzida a partir da sacarose e não da glicose e frutose ou mistura de ambas e, sendo um anidrofructosilfructosídio solúvel em água, pode ser também chamado de polifrutana pelo fato de ser constituído de moléculas de frutose. Na indústria de alimentos, a levana tem vários usos potenciais: agente espessante, fixador de cores e sabores e em produtos dietéticos. Além disso, sua hidrólise produz frutose que tem poder adoçante superior à sacarose (Ernandes; Garcia-Cruz, 2005).

A ocorrência da bactéria *Zymomonas mobilis* foi verificada em várias partes do mundo e em diversos meios açucarados (Dadds; Martin, 1973; Swings; De Ley, 1977). Na Europa, em vinhos de maçãs e de peras (Millis, 1956), em polpa de maçã (Carr; Passmore, 1971) e como contaminante em indústrias de cerveja (Dadds; Martin, 1973). No México, na fermentação da seiva do agave (Carr, 1974); na África, Ásia e Américas, fermentando vinhos de seiva de palmas diversas (Dadds; Martin, 1973).

No Brasil, especificamente em Pernambuco (nordeste brasileiro), Gonçalves de Lima isolou diversas linhagens de *Zymomonas* a partir de caldo de cana-de-açúcar fermentado, bebida popularmente conhecida como “caldo de cana picado”, e que através de estudos taxonômicos foi denominada de *Zymomonas mobilis* variedade *recifensis* (Gonçalves de Lima et al., 1970; Falcão de Moraes, 1983; Falcão de Moraes et al., 1993).

Desde a década de 1950, o Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DAUFPE) vem estudando a atividade antagonista de *Zymomonas mobilis* em infecções entéricas causadas por *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli*. Os resultados obtidos indicaram o uso

desta bactéria como agente terapêutico no combate a enterocolite e cistite, sendo obtida a regressão dos sintomas em todos os casos (Gonçalves de Lima et al., 1970).

Swings e De Ley (1977) descrevem em seu trabalho as diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis* encontradas em vários países e o pesquisador responsável por seu isolamento (Tabela 8.2).

Tabela 8.2 – Diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis* encontradas em vários países e o pesquisador responsável por seu isolamento

Linagem	Nº de linagem	Fonte	Local	Data de publicação	Isolado por
<i>Zymomonas mobilis</i>	ATCC 10988, NCIB 8938, NRRL B-806	Agave	México	1924	Lindner
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i>	1	Cidra	Bristol, U.K.	1950	Millis
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i>	2	Cidra	Bristol, U.K.	1950	Millis
<i>Zymomonas mobilis</i>	AG 11	Agave	México	1950	Gonçalves de Lima et al.
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i>	NCIB 8777, ATCC 29192	Agave	Bristol, U.K.	antes 1951	Carr
<i>Zymomonas anaeróbia</i>	D-364	Cerveja	Bristol, U.K.	1966	Shimwell
<i>Zymomonas mobilis</i>	VP1, VP2, VP3, VP4	<i>Elaeis sap</i>	Kinshasa, Zaire	1969	Swings e De Ley
<i>Zymomonas mobilis</i>	7.4	<i>Elaeis sap</i>	Kinshasa, Zaire	1969	Swings e De Ley
<i>Zymomonas mobilis</i>	70.1, 70.2, 70.3, 70.7, 70.8, 70.9, 70.10, 70.11, 70.12, 70.14	<i>Elaeis sap</i>	Kinshasa, Zaire	1970	Swings e De Ley
<i>Zymomonas mobilis</i>	CP1, CP2, CP4	caldo de cana-de-açúcar	Recife, Brasil	1970	Gonçalves de Lima et al.
<i>Zymomonas mobilis</i> var. <i>recifensis</i>	CP4	caldo de cana-de-açúcar	Recife, Brasil	1970	Gonçalves de Lima et al.

Fonte: Swings; De Ley (1977).

## Características fisiológicas do microrganismo

A bactéria *Zymomonas mobilis* é gram-negativa, não esporulante e móvel, anaeróbia facultativa, sendo que, algumas linhagens são obrigatoriamente anaeróbias. Morfologicamente, apresenta-se na forma de bastonete curto e grosso medindo de 2,0 a 6,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,0 a 1,4  $\mu\text{m}$  de largura. Quando apresenta mobilidade, possui de um a quatro flagelos polares (Falcão de Moraes, 1983). São encontradas geralmente em pares, embora também apareçam isoladas. Possuem rotas catabólicas comparativamente simples e não têm a variedade de alternativas metabólicas encontradas em outros microrganismos. De forma a gerar energia suficiente para o crescimento, a *Zymomonas mobilis* deve catabolizar substratos com altas taxas específicas de carbono, resultando em baixos rendimentos de biomassa, uma vez que, a maior parte deste substrato é incorporado no catabolismo do produto final, o etanol (Toma et al., 2003).

Em meios com altas concentrações de açúcar (melaço com mais de 15° Brix), estas bactérias ocorrem como longos filamentos de extremidades dilatadas. Em meio sólido à base de glicose, as colônias apresentam-se lenticulares de bordas regulares, de coloração branca ou creme e com 1,0 a 2,0 mm de diâmetro após 2 dias de incubação a 30°C (Swings; De Ley, 1977).

Açúcares fermentáveis com glicose, frutose e, em alguns casos, sacarose, são indispensáveis na composição do meio de cultura de *Zymomonas mobilis*. Esta fermenta glicose e frutose gerando quantidades praticamente equimolares de etanol e  $\text{CO}_2$ , formando colônias de coloração branca ou creme.

A fermentação de 1 mol de glicose dá origem a 1,6 de etanol, 1,8 moles de  $\text{CO}_2$  e pequena quantidade de outros subprodutos com lactato, acetaldeído, ácido acético, glicerol, acetoína, di-hidroxiketona, sorbitol, manitol, levana e ácido glicônico.

As condições ideais para o crescimento desta bactéria são intervalos de temperatura de 30°C a 36°C e intervalos de pH entre 5 e 7. Cultivadas em meio complexo, podem converter 98% da glicose presente em etanol,  $\text{CO}_2$ , lactato e outros, seguindo um balanço metabólico simples. Apenas 2% da glicose são utilizados para formar biomassa. As tabelas 8.3 e 8.4 mostram a porcentagem de crescimento de linhagens de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH e temperatura de incubação, respectivamente (ibidem).

Tabela 8.3 – Porcentagem de crescimento de linhagens de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH

pH inicial	% de crescimento de linhagens
3,05	0
3,5	43
3,7	71
3,85	90
5,7	100
4,5	87
8,0	0

Fonte: Swings; De Ley (1977).

Tabela 8.4 – Porcentagem de crescimento de linhagens de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de temperatura de incubação (°C)

Temperatura de incubação (°C)	% de crescimento de linhagens
30	100
34	97
36	97
38	74
40	5

Fonte: Swings; De Ley (1977).

Na hidrólise da sacarose, ou de misturas de glicose e frutose, os subprodutos da formação de etanol são principalmente a levana e o sorbitol. A frutose, formada da hidrólise da sacarose, não é primariamente transportada para o interior das células, mas sim utilizada na formação de levana e fruto-oligômeros pela ação da enzima levanasacarase (Loos et al., 1994).

A maioria das cepas requer ácido pantotênico, biotina e, ocasionalmente, alguns outros fatores de crescimento como vitamina B<sub>12</sub>, riboflavina, tiamina, ácido lipoico e ácido fólico. Além disso, altas quantidades de extrato de levedura aumentam a produção de células, mas não necessariamente a produtividade de etanol, levana ou sorbitol (Cromie; Doelle, 1980).

Belaich e Senez (1965) estudaram o efeito de pantotenato no crescimento de *Zymomonas mobilis* e observaram que a limitação desta substância resulta na redução da velocidade específica de crescimento da bactéria. Os auto-

res citam que o pantotenato é uma vitamina essencial à produção de etanol porque a bactéria não sintetiza pantotenato, mas necessita desta substância para produzir compostos orgânicos essenciais para o crescimento celular, produzindo, conseqüentemente, etanol.

Nas fermentações com *Zymomonas mobilis* em meio de cultivo contendo glicose, extrato de levedura, sulfato de amônio, fosfato de potássio e sulfato de magnésio, quando a glicose é exaurida, cessa a utilização da fonte inorgânica de nitrogênio ( $\text{NH}_4$ ) e a bactéria começa a metabolizar os aminoácidos do meio como fonte de carbono, com liberação do nitrogênio na forma de amônia, resultando num aumento do pH do meio. Caso o meio de cultivo seja alimentado novamente com glicose, o pH deste meio diminui gradualmente. Isto se deve a que o mecanismo que gera o potencial eletroquímico, e direciona o processo de transporte de entrada de glicose, opera via excreção de prótons com os produtos metabólicos por ação da enzima próton-translocante ATPase localizada na membrana celular (Ishizaki et al., 1994).

### Aspectos bioquímicos de *Zymomonas mobilis*

O processo bioquímico da fermentação alcoólica caracteriza-se como uma via catabólica na qual há a degradação de moléculas de açúcar (glicose ou frutose) no interior da célula de microrganismos (leveduras ou bactérias) até a formação de etanol e  $\text{CO}_2$ , havendo liberação de energia química e térmica. A glicólise é a via central do catabolismo da glicose, sendo que o piruvato é o produto final desse processo, o qual pode seguir diferentes vias metabólicas: fermentação alcoólica; lática, ciclo de Krebs e cadeia respiratória (Figura 8.2).

Na fermentação alcoólica por leveduras, o piruvato é descarboxilado, formando acetaldeído e, posteriormente, reduzido a etanol. A equação da fermentação alcoólica apresenta-se da seguinte maneira:



O metabolismo de açúcares por *Zymomonas mobilis*, ilustrado na Figura 8.3, aparece como uma “via metabólica” com algumas ramificações. A

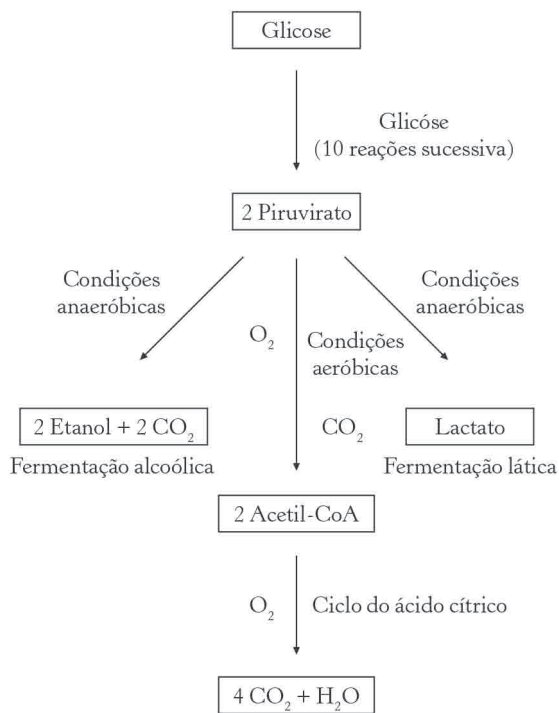
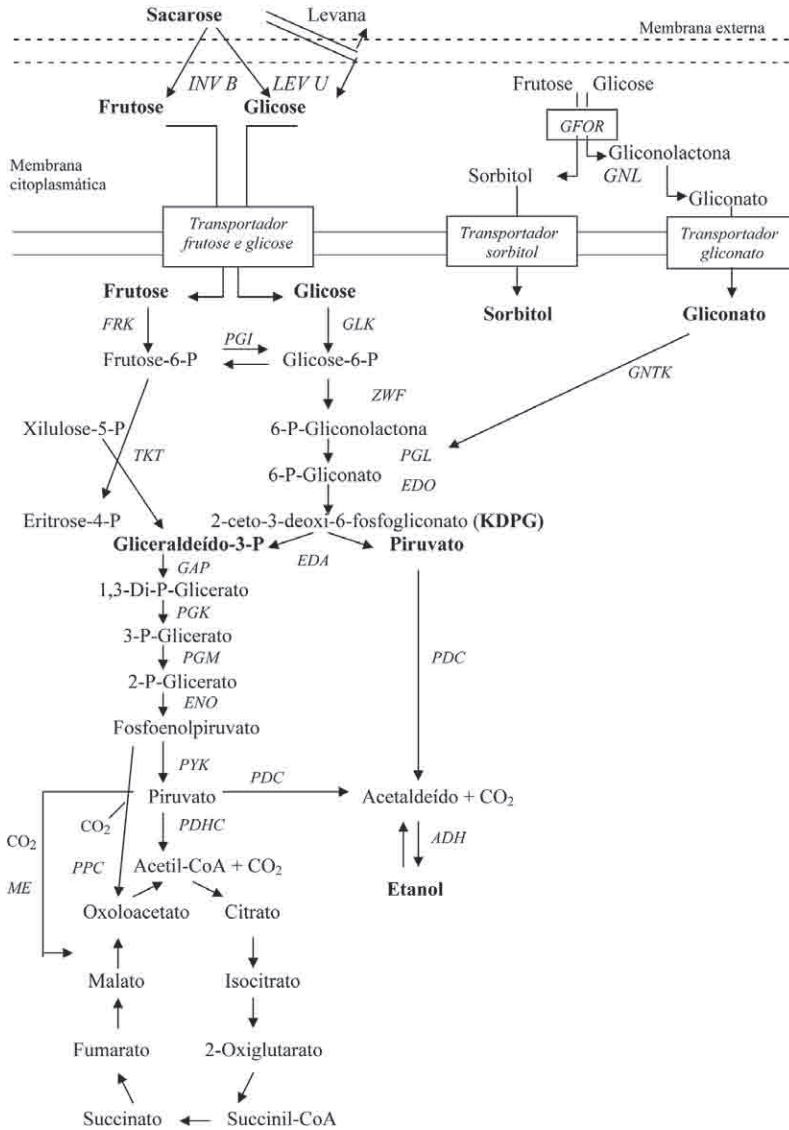


Figura 8.2 – Catabolismo da glicose pelas diferentes vias.

Fonte: Lehninger, 2002

sacarose é metabolizada a glicose e frutose pela ação das enzimas invertase (INV B) e levanasacarase (LEV U). As duas hexoses entram na célula via sistema de difusão facilitada (GLF) ou são convertidas pela GFOR (glicose-frutose oxirredutase), uma enzima contendo NADP (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato) que existe apenas na bactéria *Zymomonas mobilis*. A enzima GFOR madura está localizada no periplasma, oxida glicose a gliconolactona e reduz frutose a sorbitol. Gliconolactona é, então, convertida pela gliconolactonase (GL), outra enzima periplasmática, em ácido glicônico (gliconato). Ambas as enzimas são os principais constituintes do periplasma, formando aproximadamente 20% a 30% das proteínas deste compartimento. O ácido glicônico é consumido pelas células e pode ser completamente degradado (como um cossustrato) a etanol e ácido acético. O sorbitol é produzido para neutralizar o efeito prejudicial de estresse osmótico (Sprenger, 1996).





Legendas: *INV B*: invertase; *LEV U*: levansacarase; *GFOR*: glicose-frutose oxidorreductase; *GNL*: gliconolactonase; *FRK*: frutoquinase; *GLK*: glicokinase; *PGI*: fosfoglicose isomerase; *ZWF*: glicose-6-fosfato desidrogenase; *GNTK*: gliconatoquinase; *TKT*: transquetolase; *PGL*: 6-fosfogliconolactonase; *EDO*: 6-fosfogliconato desidrogenase; *GAP*: gliceráldeido 3-fosfato desidrogenase; *EDA*: 2-ceto 3-dioxi 6-fosfogliconato aldolase; *PGK*: fosfoglicerato quinase; *PGM*: fosfoglicerato mutase; *ENO*: enolase; *PYK*: piruvato quinase; *PPC*: fosfoenolpiruvato carboxilase; *PDHC*: piruvato desidrogenase; *ADH*: piruvato descarboxilase álcool deidrogenase; *PDC*: fosfatase

Figura 8.3 – Metabolismo dos carboidratos em *Zymomonas mobilis*.

Fonte: Sprenger (1996)

## Tecnologia da produção de etanol por *Zymomonas mobilis*

Em vários países têm sido realizados estudos de fermentação que incluem o uso de bactérias em vez de leveduras para reduzir o tempo de fermentação. No Brasil, toda a produção industrial de álcool é realizada utilizando leveduras como microrganismo da fermentação e pouco se conhece de outros microrganismos que produzam álcool em escala industrial.

Vários autores consideram ser *Zymomonas mobilis* um excelente produtor de etanol, uma vez que possui várias vantagens perante as leveduras. *Zymomonas mobilis* são mais termotolerantes, mais osmotolerantes, mais tolerantes a altas concentrações de álcool e capazes de converter mais rapidamente o substrato em etanol (Rogers et al., 1982, Lawford et al., 1982). Além disso, *Zymomonas mobilis* tem resistência natural a vários antibióticos e não requer oxigênio para a síntese de lipídeos (Ingram et al., 1984). Apresenta um ciclo de fermentação rápida e com elevada eficiência; apresenta tolerância a elevadas concentrações de glicose, de sacarose e de etanol no meio de cultura; tolera pH entre 2,5 e 7,5 e apresenta bom rendimento em etanol. Esta produção de etanol é favorecida numa faixa de pH entre 4,5 e 7,0, pois o pH ideal para o crescimento da bactéria varia de acordo com a cepa utilizada (Swings; De Ley, 1977; Viikari; Gisler, 1986; Calazans et al., 1989).

Em 1979, Rogers e colaboradores estudaram a cinética de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 e *Saccharomyces carlsbergensis* (*uvarum*), em altas concentrações de açúcar, e observaram que ambos os microrganismos fermentaram completamente 250 g/L de glicose, produzindo etanol, em 30 a 40 horas, com concentração final de etanol superior a 100 g/L. Além disso, a concentração de biomassa de *Zymomonas mobilis* foi consideravelmente menor que a massa obtida pela levedura, indicando maior velocidade específica de consumo de açúcar e de produção de etanol para *Zymomonas*.

Após a descoberta da capacidade de *Zymomonas mobilis* de produzir etanol, através das observações feitas em fermentações de bebidas alcoólicas, iniciou-se o estudo de uma possível utilização dessa bactéria para produção de etanol em larga escala. Neste caso, a *Zymomonas* torna-se concorrente do principal microrganismo responsável pela produção de etanol: o *Saccharomyces cerevisiae* (Swings, De Ley, 1977; Viikari, 1988, Ernandes; Garcia-Cruz, 2009, 2010).

## Fatores que influenciam a fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis*

É muito importante considerar que diversos fatores físicos (temperatura e pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, inibidores, nutrientes minerais e orgânicos) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura e contaminação bacteriana) afetam o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcares em etanol. Geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando à maior formação de produtos secundários (especialmente glicerol e ácidos orgânicos) e biomassa (Braga, 2006; Shreve; Brink, 1997; Lima et al., 2001).

### Nutrientes

A composição do meio de cultura afeta significativamente o consumo de glicose, o crescimento celular e a produção de etanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* (Cromie; Doelle, 1981).

A presença de magnésio é muito importante na fermentação por *Zymomonas*, desde que íons magnésio são requeridos como cofatores de várias enzimas da via Entner Doudoroff, incluindo glucoquinase, glicose 6-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase e enolase (Millar et al., 1982, Sols et al., 1971). Hoppner e Doelle (1983) reportaram que o cálcio e o magnésio ativam a enzima piruvato descarboxilase em *Zymomonas*, enquanto Bekers e colaboradores (2000) observaram que o potássio ativa a enzima piruvato quinase. Segundo Dawes e Large (1970), o íon magnésio tem um papel importante na prevenção da degradação do RNA prolongando a sobrevivência das *Zymomonas*.

Vários trabalhos descrevem que a taxa de desenvolvimento celular de *Zymomonas mobilis* pode ser influenciada de acordo com as concentrações usadas de íons potássio, magnésio, cálcio, sódio e cloro. A presença dos sais minerais, quando interagem com outra variável do meio de fermentação contendo sacarose comercial, também influenciam significativamente no crescimento de *Zymomonas mobilis*.

Segundo Lawford e colaboradores (1982), a presença de biotina (1,0 mg/L) e pantotenato de cálcio (1,5 mg/L) favorecem um melhor crescimento desta bactéria. A inclusão de extrato de levedura no meio de cultivo fornece

as vitaminas necessárias ao crescimento de *Zymomonas mobilis*, conforme Fein e colaboradores (1983). Ernandes (2006) obteve concentração celular de 2,0 g/L com a ausência de extrato de levedura no meio de produção, mas esta foi proporcional ao aumento do extrato no meio obtendo concentração de 12,6 g/L de biomassa com 10,0 g/L de extrato. O mesmo autor relatou que, para a síntese de levana, há necessidade de adição do extrato de levedura ao meio de cultura, porém em quantidades adequadas, evitando assim a influência negativa deste na produção de levana.

Observa-se haver um consenso de que o meio de cultivo para *Zymomonas mobilis* requer diferentes sais, tais como sulfato de amônio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio, citrato de sódio, traços de  $\text{Fe}^{+2}$  e, ainda, vitaminas como biotina e pantotenato de sódio (Nipkow et al., 1985).

Ernandes (2006) observou em sua pesquisa que a alta concentração de potássio proporcionou maior taxa de desenvolvimento de duas linhagens de *Zymomonas mobilis* (CCT 4494 e CP4) e de *Bacillus subtilis*. Jerez (1993) estudou o efeito da variação da concentração de potássio e verificou que a taxa de desenvolvimento foi proporcional ao aumento da concentração de potássio até a concentração de 10,0 g/L. O mesmo autor, entretanto, verificou que KCl, em concentrações superiores é inibidor da produção etanol e do crescimento de *Zymomonas*.

Diez e Mancilha (1990) mostraram que, utilizando caldo de beterraba açucareira, a presença ou ausência  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  não afetou os rendimentos fermentativos nem apresentou efeito inibidor da *Zymomonas mobilis* CP4. Entretanto, são contraditórios aos reportados por Skotnicki e colaboradores (1981), que indicaram que o  $\text{Mg}^+$  pode ter efeito inibidor da fermentação por *Zymomonas*, e aos resultados obtidos por Cromie e Doelle (1981), os quais observaram incremento na taxa específica de consumo de substrato e de produção de etanol com o aumento da concentração de magnésio até a concentração de 3,0 g/L. A concentração de etanol também foi aumentada com o aumento da concentração de magnésio até 3,0, diminuindo levemente quando a concentração aumentou para 4,5 g/L.

### **Pressão osmótica**

*Zymomonas mobilis* pode crescer em concentrações relativamente elevadas de açúcar (Park; Baratti, 1993). Segundo Belaich e Senez (1965) e

DiMarco e Romano (1985), a glicose é transportada em alta velocidade, através da membrana plasmática, sendo sua condução facilitada pelo sistema de difusão. Assim, a concentração intracelular rapidamente alcança um nível limite em relação às concentrações externas de glicose. Outros autores (Algar; Scopes, 1985) verificaram que a pressão osmótica extracelular pode ser rapidamente balanceada pela concentração intracelular de açúcares e que a redução da atividade de água parece exercer pequeno efeito sobre as enzimas da via de Entner-Doudoroff.

Na literatura, são encontrados alguns trabalhos que buscam elucidar o fato de esta bactéria tolerar concentrações elevadas de açúcar. Struch e colaboradores (1991) observaram que a cepa ATCC 29191 de *Zymomonas mobilis* apresenta alta tolerância a elevadas concentrações de açúcares por causa de sua elevada capacidade de regulação osmótica e do eficiente sistema de transporte de glicose. Estudos comparativos realizados por Swings e De Ley (1977) com quarenta diferentes cepas de *Zymomonas mobilis* observaram que a maioria apresenta capacidade de crescer em meio contendo 30% a 40% (p/v) de glicose.

A cinética de produção de etanol por *Zymomonas*, em altas concentrações de açúcar, foi estudada por Rogers e colaboradores (1979). Resultados revelaram que 100 a 250 g/L de açúcar podem ser rápida e eficientemente convertidos em etanol. Comparando *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 e *Saccharomyces carlsbergensis* (*uvarum*) ATCC 26602, esses autores encontraram que ambos os microrganismos fermentam completamente 250 g/L de glicose, produzindo etanol, em 30 a 40 horas, com concentração final de etanol superior a 100 g/L. A concentração de biomassa de *Zymomonas mobilis* foi consideravelmente menor que a massa obtida por *S. uvarum*, indicando maior velocidade específica de consumo de açúcar e de produção de etanol por *Zymomonas*.

Lyness e Doelle (1983) determinaram a glicose livre no meio, a fim de estabelecer a correlação entre hidrólise de sacarose, formação de glicose e utilização de glicose em duas cepas de *Zymomonas*. As duas cepas estudadas, Z7 e Z10, apresentaram respostas diferentes. A cepa Z7 apresentou alta atividade de invertase acompanhada da não utilização de glicose, e significativo acúmulo de glicose no fermentador. Os autores concluíram que o incremento no acúmulo de glicose em consequência do aumento

da concentração de sacarose pode indicar limitado sistema metabólico ou progressiva inibição pelos dois carboidratos monoméricos sobre o sistema enzimático catabólico.

Loos e colaboradores (1994) relataram em sua pesquisa que, em seu *habitat* natural, *Zymomonas* se encontra exposta a altas concentrações de sacarose. Neste caso, o sorbitol é produzido e acumulado pelas células, pela ação das enzimas periplasmática glicose-frutose oxidoreductase (GFOR). A função fisiológica da formação de sorbitol é, portanto, proteger as células do *stress* osmótico causado pelas altas concentrações de açúcar.

### **Presença de etanol**

O etanol tem um efeito prejudicial sobre a membrana celular de *Zymomonas*, diminuindo sua eficácia como barreira semipermeável e permitindo a saída de cofatores e coenzimas essenciais (Viikari, 1984). Ainda segundo Ingram (1984), altas concentrações de etanol geralmente destroem a estrutura e as funções da membrana celular. De acordo com Bringer e colaboradores (1985), a membrana precisa permitir uma alta velocidade de difusão para fora do citoplasma e, ao mesmo tempo, necessita opor-se a suas propriedades solventes. Viikari (*ibidem*) afirmou que, em geral, o efeito inibidor do etanol pode estar relacionado à desregulação da função da membrana à inibição das enzimas glicolíticas. Em células de *Zymomonas mobilis*, entretanto, as enzimas glicolíticas não são inibidas pela presença de etanol e a via metabólica é indiretamente inibida pela perda de cofatores e coenzimas, provavelmente por causa da ação do etanol sobre a membrana celular (Buchholz et al., 1987).

Segundo Rowe (1983), em baixas concentrações (menores que 25 g/L), o etanol diminui a temperatura de transição e, portanto, fluidiza a membrana. Sob altas concentrações (maiores que 25 g/L), ocorre o chamado efeito “freezing”, no qual se verifica um simultâneo aumento de temperatura de transição e cooperatividade do processo de transição.

Em *Zymomonas mobilis*, tanto a boa capacidade de difusão de sua parede celular quanto sua resistência à ação prejudicial do etanol se devem à grande quantidade de ácido cis-vacênio presente na parede (cerca de 70%). Por possuir alta fluidez, esse ácido graxo é, provavelmente, o responsável pela alta velocidade de difusão do etanol pela membrana citoplasmática (*ibidem*).

A presença de hopanoides como 1, 2, 3, 4-tetra hidroxipentano 29-hopeno (THBH), principalmente, parece ser a causa da considerável estabilidade da membrana plasmática sob altas concentrações de etanol (Schmidt et al., 1986).

Altas concentrações de THBH, assim como hopeno e hopanol, foram verificadas em *Zymomonas mobilis*. Essas substâncias foram primeiramente encontradas em várias frações de óleo minerais (Ourisson et al., 1985). Laudrin e Goma (1982) observaram, em fermentação por *Zymomonas mobilis*, um aumento significativo de THBH durante a fase exponencial de crescimento. Este aumento ocorreu no momento em que o etanol intracelular era acumulado. Por essa razão, a formação destes lipídeos parece ter correlação primária com o etanol intracelular, cuja concentração é maior que aquela medida no meio de cultura.

O THBH contido nas células bacterianas aumenta consideravelmente com o acúmulo de etanol intracelular. Isso indica que a tolerância ao etanol está provavelmente correlacionada com a presença de hopanoides nas células. *Zymomonas mobilis* reage à ação solvente do etanol com o aumento da biossíntese e incorporação de hopanoides. Os hopanoides têm, nas bactérias, uma função aparentemente similar aos esteroides nas leveduras. Estes compostos estabilizam a membrana, fazendo que os microrganismos resistam ao etanol. A formação dos hopanoides está diretamente correlacionada com a diminuição da proporção de fosfolopídeos/proteínas na membrana de *Zymomonas mobilis*, aumentando a estabilidade da membrana plasmática pelo aumento da hidrofobicidade. Os hopanoides são sintetizados nas células bacterianas, tanto em condições de aerobiose como anaerobiose. Já os esteroides nas leveduras são sintetizados apenas em aerobiose (Carey, Ingram, 1983).

Erzinger (1996) estudou, em regime descontínuo e descontínuo alimentado, a influência da concentração inicial de glicose e do etanol formado sobre a atividade da GFOR em células íntegras de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. A GFOR é a mais importante enzima envolvida na conversão de glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol, respectivamente. Neste estudo, o crescimento celular e a produção de etanol foram também considerados. Adicionalmente, ensaios de biotransformação, para a produção de sorbitol e ácido glucônico, foram realizados. Com concentrações iniciais de glicose (G0) entre 40 e 100 g/L foram medidas as máximas velocidades

específicas de crescimento ( $\mu_{X,M} = 0,48 \text{ h}^{-1}$ ). Acima desta faixa, a concentração de glicose inibiu, progressivamente, o crescimento de *Z. mobilis*. Com  $G_0 = 230 \text{ g/L}$ , o valor de  $\mu_{X,M}$  foi de, apenas,  $0,17 \text{ h}^{-1}$ . Com concentrações de etanol maiores que  $35 \text{ g/L}$ , observa-se uma diminuição da velocidade específica de crescimento ( $\mu_X$ ), indicando um efeito inibidor deste produto sobre o crescimento celular. O fator de conversão de glicose em células ( $Y_{x/s}$ ) máximo obtido foi de, aproximadamente,  $0,042$ , com  $G_0$  até  $100 \text{ g/L}$ . Os valores de  $G_0$  maiores que  $100 \text{ g/L}$  levaram, à redução de  $Y_{x/s}$ . As máximas velocidades específicas de formação de etanol ( $\mu_{Et,m}$ ) se mantiveram, aproximadamente, constantes entre  $4,3$  e  $4,9 \text{ h}^{-1}$ , com  $G_0$  entre  $40$  e  $210 \text{ g/L}$ . O valor de  $\mu_{Et,m}$  ( $3,4 \text{ h}^{-1}$ ), entretanto, diminuiu com  $G_0 = 230 \text{ g/L}$ . Com relação à conversão em produto ( $Y_{Et/S}$ ), foram obtidos valores, aproximadamente, constantes ( $Y_{Et/S} \sim 0,49$ ), até  $G_0$  de  $150 \text{ g/L}$ . Concentrações iniciais de glicose maiores que  $210 \text{ g/L}$  resultam em diminuição de  $Y_{Et/S}$ . Tal como descrito por Zachariou e Scopes (1986) para a enzima livre, a atividade de GFOR (A) em células íntegras de *Z. mobilis*, mostrou ser dependente da concentração de glicose utilizada no cultivo da bactéria. Valores crescentes de atividade foram medidos até  $G_0 = 150 \text{ g/L}$ , condição na qual se verificou o mais alto valor de A ( $\sim 12,5 \text{ U/g}$  de células). Com  $G_0 = 230 \text{ g/L}$ , A ( $3,6 \text{ U/L}$ ) foi drasticamente reduzido. As menores atividades de GFOR em células íntegras, com  $G_0 > 150 \text{ g/L}$ , são decorrentes das concentrações elevadas de etanol alcançadas nestes casos (Ex.:  $G_0 \sim 210 \text{ g/L}$ ,  $Et \sim 94 \text{ g/L}$ ). Este efeito se deve, provavelmente, a alterações na interação enzima/substrato, relacionadas com a formação de hopanoides, ácidos graxos produzidos por *Z. mobilis* na presença de altas concentrações intracelulares de etanol, cuja função é a impermeabilização da parede celular, a fim de proteger o microrganismo da ação solvente do etanol. O processo de biotransformação de glicose e frutose em ácido glucônico e sorbitol foi realizado utilizando células provenientes de diferentes condições de cultivo. Nos ensaios com células íntegras que apresentavam alta atividade em GFOR.

## Temperatura

Segundo Doelle e colaboradores (1989), a temperatura utilizada para o crescimento é diferente da requerida para a produção de etanol. *Zymomonas*



*mobilis* apresenta melhor crescimento em temperatura entre 25°C e 37°C. A temperatura ótima em meios contendo sacarose como fonte de carbono é de 35°C, porém a 38°C, ocorre uma diminuição de aproximadamente 26% do crescimento e, em temperaturas próximas de 40°C, o crescimento é raro, dificultado ou inibindo a produção de etanol (Lee et al., 1989). Quando exposta à temperatura da ordem de 60°C por 5 minutos, *Zymomonas mobilis* sofre inativação irreversível (Viikari, 1984).

Lee e colaboradores (1989) verificaram o comportamento de duas diferentes cepas de *Zymomonas mobilis* (ZM1 e ZM4) com relação à sensibilidade à temperatura de 25°C a 40°C e observaram que, em temperaturas mais altas, os rendimentos da biomassa e de etanol decresciam. Porém as velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de formação de produtos não foram afetadas pela temperatura na faixa de pH estudada.

Em estudos feitos por Fieschko e Humphrey (1983), a respeito do efeito da temperatura sobre o coeficiente de manutenção de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988, cultivada em processo contínuo com glicose como fonte de carbono, foi observado que, entre 23°C e 33°C o coeficiente de manutenção se manteve constante. Com o aumento da temperatura de 30°C para 35°C foi verificado que o fator real de conversão de substrato em células apresentava pouca variação, enquanto o coeficiente de manutenção era sensivelmente afetado.

Borrego e colaboradores (1987) estudaram o efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos de fermentação por *Zymomonas* e encontraram, na faixa de temperatura de 25,0°C a 35,0°C, que a produtividade de etanol permaneceu constante, em aproximadamente 49,0 g/L.h, e que estes valores diminuíram em temperatura menores que 25,0°C. Lyness e Doelle (1980) também observaram variação na produção de etanol na faixa de 30,0 a 42,5 g/L, em função da variação da temperatura em meio utilizando sacarose (200,0 g/L), sendo que para faixa de temperatura entre 30,0°C e 35,0°C encontraram concentrações de etanol de 69,5 g/L para *Zymomonas mobilis* Z7 e de 66,1 g/L para *Zymomonas mobilis* Z10.

Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) produziram etanol com cepas de *Zymomonas mobilis* B4286 e dois mutantes (ZML1 e ZML2) obtidos por meio do tratamento com NTG (N-metil N' nitroso guanidina) e atingiram a produção máxima de etanol de 55,1; 41,0 e 44,2 g/L, respectivamente em

24 horas de fermentação a 30°C com sacarose na concentração de 150,0 g/L, e observaram que os mutantes ZML1 e ZML2 possuem taxas de produção de etanol significativamente menores que a cepa natural.

## pH

O pH ideal para o crescimento varia de acordo com a cepa utilizada (Calazans et al., 1989). Estudos ressaltam a importância do controle de alguns parâmetros de fermentação na formação dos subprodutos para aumentar o rendimento alcoólico (Diez et al., 1991). De modo geral, na literatura consta que a produção de etanol é favorecida em valores de pH entre 4,5 e 7,0 e que o controle do pH inicial é importante para que se possa maximizar a produção de etanol e reduzir a formação de outros subprodutos, como biopolímeros e sorbitol (Kannan et al., 1997). Relação similar foi descrita por Diez e colaboradores (1991), os quais relataram que o controle do pH foi um fator muito importante na hidrólise da sacarose e, portanto, na formação de etanol, concluindo ainda que os rendimentos fermentativos foram superiores na fermentação com controle de pH.

Doelle e colaboradores (1989) relataram que o pH, dentro de certos limites (6,5 a 8,0), tem pouca influência na taxa de desenvolvimento, mas pode influenciar o número total de bactérias, no entanto, valores de pH extremamente baixos (menores que 4,5) podem levar o microrganismo rapidamente à morte.

Lawford e colaboradores (1988) observaram que os maiores valores de velocidade específica de crescimento com *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 são obtidos com pH entre 5,5 e 6,5, sendo o pH 6,0, aparentemente, o ótimo. King e Houssain (1982), trabalhando com uma cepa diferente *Zymomonas mobilis* ATCC 10988, concluíram que, na faixa de pH 6,0 a 7,5, a bactéria tem um melhor crescimento.

Trabalhos realizados por Calazans e colaboradores (1990) indicaram que fermentações em meio de glicose iniciadas em pH não controlado na faixa de 5,3-6,6 apresentaram bons resultados em termos de rendimento e produtividade de etanol; porém, os valores obtidos nesses parâmetros foram reduzidos drasticamente em pH 4,2.

Na Tabela 8.5, observa-se o efeito da variação do pH sobre alguns parâmetros de fermentação para a produção de etanol por 4 linhagens de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988, ATCC 12526, NRRL B 4286 e IFO 13756).

Tabela 8.5 – Efeito do pH inicial sobre a produção de etanol por várias linhagens de *Zymomonas mobilis*

pH	Parâmetros fermentativos	Linhagens			
		ATCC 10988	ATCC 12526	NRRL B 4286	IFO 13756
4,0	P	2-7	2-2	4-0	3-5
	Su	74-4	68-1	85-6	75-0
	g/gs	26-37	21-48	0-23	0-23
	E	0-18	0-16	39-06	34-18
5,0	P	2-9	3-2	4-2	4-4
	Su	ND	ND	87-5	81-3
	g/gs	ND	ND	0-24	0-27
	E	28-32	31-25	41-02	42-97
6,0	P	3-9	4-0	4-3	4-7
	E	80-6	81-2	0-25	88-1
	g/gs	38-09	0-25	87-5	0-27
	Su	0-24	39-06	41-99	45-9
7,0	P	6-6	6-3	5-2	6-4
	E	82-77	79-0	88-1	92-5
	g/gs	0-40	0-40	0-30	0-35
	Su	64-45	64-51	50-29	62-5

P – produtividade de álcool % (v/v); Su – substrato utilizado % (v/v); g/gs – gramas de álcool produzido/g de substrato utilizado; E – porcentagem teórico de rendimento; ND – não determinado.

Fonte: Gunasekaran; Karanakaran; Kasthuribai (1986)

## Oxigênio

A habilidade de *Zymomonas* crescer em presença de oxigênio foi observada por Lindner (1977). Portanto, *Zymomonas* não pode ser considerada uma bactéria anaeróbia estrita.

Bringer e colaboradores (1985) investigaram os efeitos do oxigênio no crescimento e metabolismo de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. Estes autores verificaram que, de fato, a inibição do crescimento celular em culturas aeradas foi maior com o aumento da concentração de açúcar, pelo acúmulo de acetaldeído formado. Estes autores observaram também que as velocidades específicas de produção de etanol e do consumo de substrato foram 25% a 40% menores na presença de oxigênio do que em condição de anaerobiose.

Pankova e colaboradores (1985) comprovaram que o declínio da atividade metabólica de *Zymomonas mobilis* em regime descontínuo com alto suprimento de oxigênio foi resultante do acúmulo de acetaldeído formado. A formação de acetaldeído leva a uma diminuição da velocidade máxima de crescimento e do rendimento em células. Ainda, segundo estes autores,

a conversão do acetaldeído em etanol, pela enzima álcool desidrogenase (ADH), é prejudicada em presença de oxigênio. Isso se deve ao fato da ADH necessitar NADH como cofator, e ao fato de *Zymomonas*, em aerobiose, priorizar a remoção de oxigênio por meio de enzimas protetoras como NADH oxidase e NADHP oxidase. Estas enzimas, além de também usarem NADH como cofator, apresentam maior atividade que ADH, acarretando num acúmulo do acetaldeído formado.

### Concentração de açúcar

*Zymomonas mobilis* precisa de um açúcar fermentável no meio de cultura para o crescimento, podendo ser glicose ou frutose ou ainda, para algumas linhagens, sacarose (Dadds; Martin, 1973), entretanto, uma maior desvantagem da aplicação da *Zymomonas* foi apresentada por Stokes e colaboradores (1981) com respeito à restrita utilização dos açúcares como substrato.

Emprega-se a bactéria *Zymomonas mobilis*, geralmente para produção de etanol a partir da sacarose, frutose e glicose (Falcão de Moraes et al., 1993). Na fermentação em alta concentração inicial de sacarose, porém, a taxa de hidrólise deste dissacarídeo é maior do que o consumo de seus monossacarídeos (Parker et al., 1997; Tano et al., 2000). Conseqüentemente, os monossacarídeos acumulam-se no caldo de fermentação e favorecem a formação de subprodutos, como levana, polímero de frutose, que torna o meio turvo (Ribbons et al., 1962) e sorbitol (Barrow et al., 1984) o que reduz o rendimento em etanol (Kannan et al., 1997; Parker et al., 1997). Além disso, é também capaz de produzir outros metabolitos em altas concentrações sob condições de cultura adequadas como, por exemplo, acetaldeído, ácido glucônico e ácido acético (Belaich; Senez, 1965), gluconato e fructooligossacarídeos e pequenas quantidades de alguns álcoois superiores e fenol (Bekers et al., 1999).

Esta bactéria que utiliza a via metabólica de Entner Doudoroff fermenta glicose, frutose e sacarose. Por esta via metabólica, a bactéria obtém 1 mol de ATP por mol de glicose, conseqüentemente deve minimizar os requerimentos energéticos de crescimento e manutenção, de modo a conduzir o máximo de glicose possível para a produção de etanol (Cromie, Doelle, 1980). Quando glicose e frutose são utilizadas como fonte de carbono, é obtido um rendimento superior a 95% em relação ao rendimento teórico (Lee et al., 1989), já que a fermentação produz quase exclusivamente etanol e CO<sub>2</sub> (Swings;

Deley, 1977). Quando sacarose, um substrato industrialmente disponível e de baixo custo, é utilizado, o rendimento de etanol representa 75-80% do valor teórico, em função da formação dos subprodutos (Viikari, 1984).

Dawes e colaboradores (1966) observaram, no meio contendo frutose, rendimento de massa celular relativamente baixo e crescimento lento. No meio contendo sacarose, a redução observada no rendimento da massa celular comparando-se ao crescimento em glicose tem sido atribuída à formação de levana (Lee et al., 1989; Ribbons et al., 1962).

Skotnicki e colaboradores (1981) estudaram as velocidades de crescimento e produção de etanol de 11 diferentes cepas de *Zymomonas*. Os resultados revelaram que algumas cepas são mais tolerantes a altas concentrações de açúcar e de etanol que outras. Das duas cepas selecionadas a CP4 foi superior à ATCC 10988 em todas as condições de crescimento em meio contendo glicose, enquanto no meio preparado com sacarose, o crescimento e a produção de etanol das duas cepas foram similares, embora a CP4 seja menos produtiva em meio com sacarose e mutações provocadas não tenham melhorado significativamente a produção de etanol a partir deste carboidrato.

Lyness e Doelle (1983) estudaram a fermentação descontínua da sacarose com duas linhagens de *Zymomonas mobilis* e observaram que um aumento na concentração de sacarose afetou a velocidade específica de crescimento na linhagem Z10, bem como a atividade hidrolisante da sacarose para a linhagem Z7, mas não influenciou significativamente a formação de biomassa. Demonstraram que a hidrólise da sacarose pode ser independente da utilização da glicose, que, de acordo com a linhagem usada, a hidrólise da sacarose pode levar ao acúmulo de glicose no meio e que a velocidade de produção de etanol e o tempo de fermentação dependem da velocidade de catabolismo dos produtos de hidrólise da sacarose.

Viikari e Gisler (1986) observaram baixa velocidade de hidrólise da sacarose, a qual parece estar associada com a formação de levana, pois *Zymomonas mobilis* utilizou o substrato inicial para seu crescimento e para favorecer, possivelmente, a atividade da enzima levanasacarase extracelular (SacB), que converte a sacarose em frutanas com pontes  $\beta$  (2-6), formando a cadeia de levana (Kannan et al., 1993). Essa distribuição da fonte de carbono para o crescimento celular e formação de frutanas também foi observada por Dawes e Ribbons (1966), os quais acompanharam a formação de levana durante o crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* N.C.I.B. 8938.

Wisbeck e colaboradores (1997), em trabalhos realizados com diferentes linhagens desta bactéria, relatam rendimentos em etanol superiores a 90%. Estes autores descrevem, entretanto, que altas concentrações iniciais de glicose, em processo em batelada, levam a significativa redução da produtividade por causa da inibição pelo substrato.

Na Tabela 8.6, observa-se o efeito da concentração inicial de açúcar sobre alguns parâmetros de fermentação para a produção de etanol por 4 linhagens de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988, ATCC 12526, NRRL B 4286 e IFO 13756).

Tabela 8.6 – Efeito da concentração inicial de açúcar sobre a produção de etanol por várias linhagens de *Zymomonas mobilis*

Açúcar inicial % v/v	Parâmetros fermentativos	Linhagens			
		ATCC 10988	ATCC 12526	NRRL B 4286	IFO 13756
15	P	6-6	6-3	5-1	6-1
	Su	82-77	79-0	88-0	93-3
	g/gs	0-43	65-63	0-31	0-33
	E	68-75	0-44	53-13	63-54
20	P	5-9	6-1	10-15	8-85
	Su	73-0	0-33	89-0	91-0
	g/gs	46-09	75-0	0-46	0-39
	E	0-32	47-65	79-29	69-14
25	P	5-2	5-5	7-9	7-2
	E	76-0	78-0	84-8	75-6
	g/gs	0-22	0-23	49-38	0-30
	Su	32-05	34-38	0-30	45-0

P – produtividade de álcool % (v/v); Su – substrato utilizado % (v/v); g/gs – gramas de álcool produzido/g de substrato utilizado; E – porcentagem teórico de rendimento.

Fonte: Gunasekaran; Karanakaran; Kasthuribai (1986)

## Bioprocessos fermentativos empregados na fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis*

Bioprocessos são um conjunto de operações que vão desde o tratamento da matéria-prima, passando pela transformação do substrato em produto(s), até a separação e purificação do produto obtido; e nesta categoria estão incluídas as produções industriais do álcool para fins de consumo humano e combustível (Pereira Jr., 1999).

A importância deste tipo de processo tem relação direta com os diversos setores da agroindústria, destacando-se entre estas a alcooleira (Belluco, 2001). Segundo Robinson, (1980), a fermentação, em termos gerais, é um processo de transformação bioquímica em que se potencializa deliberadamente o crescimento dos microrganismos que consomem certa quantidade de substrato e enriquecem o meio de cultivo com os produtos de seu metabolismo. A fermentação tem como efeitos principais o aumento do valor nutricional e modificações desejáveis na textura e aroma das matérias-primas e dos alimentos produzidos por este tipo de biotecnologia.

Quanto à disponibilidade de água presente no meio, os processos fermentativos podem ser classificados em fermentação submersa e semissólida. Dependendo do tipo de produto a ser obtido, a fermentação pode ser realizada com ou sem aeração (Pereira Jr., 1999; Bertolin et al., 1998a). Na fermentação alcoólica, o processo acontece em anaerobiose, podendo ser submerso como ocorre industrialmente na produção de álcool de cana-de-açúcar ou semissólida, como no processamento artesanal e tradicional de algumas bebidas fermentadas (Maccari Jr., 1997).

Na produção de materiais via fermentação submersa ou semissólida, dependendo da natureza do produto a ser obtido, existe a necessidade do conhecimento e otimização dos seguintes parâmetros: composição do meio de cultivo, temperatura, pH, condições de aeração e agitação, a presença de indutores e repressores; além é claro da escolha adequada do microrganismo a ser usado (Bertolin et al., 1998a).

Em relação à escolha do método de fermentação, estudos como o de Bertolin e colaboradores (1998b), que investigaram a hidrólise do amido de farelo de trigo via sistema submerso e semissólido; indicam haver equivalência de resultados para os dois tipos de técnicas, ficando a definição por conta de critérios referentes aos menores custos de produção e maior qualidade do produto formado a ser obtido, conforme o sistema escolhido.

Quanto à condução dos processos, estes podem ser: em batelada, simples e alimentada e, sistema contínuo. No sistema em batelada, o substrato é disponibilizado em sua totalidade no início do processo (simples) ou ao longo deste (alimentada), sem haver retirada do produto. Enquanto no contínuo, ocorre uma oferta gradativa de substratos e há retiradas periódicas do produto formado (Pereira Jr. 1999).

Os processos de fermentação alcoólica são frequentemente conduzidos pelo sistema em batelada, onde no tipo submerso as células ficam em suspensão (Kaseno; Kokugan, 1997). A fermentação em batelada, na qual a formação do produto está diretamente relacionada ao microrganismo biocatalisador, tem como principal desvantagem, a forte inibição de grande número de linhagens dos microrganismos pelo produto e mesmo pelo substrato. Enquanto no processo de fermentação contínuo, usando-se células de leveduras imobilizadas, tem-se como vantagem a redução de custos operacionais e de capital, além da alta produtividade em etanol em longos períodos de fermentação (Tosta, 2004).

Uma estratégia eficiente para evitar a inibição da atividade metabólica pelo produto formado, no caso de bioprocessos para produção de álcool, onde o acúmulo de etanol durante longo período acarreta progressivos decréscimos do crescimento celular e produtividade, é a contínua remoção do álcool produzido; o que pode ser conseguido ao usar o sistema semicontínuo (Kaseno; Kokugan, 1997).

Os processos contínuos são favorecidos, em muitos aspectos, na indústria de fermentação por muitas razões, incluindo as vantagens econômicas de ter operações ininterruptas por longos períodos. Estes processos promovem substanciais melhorias na eficiência do processo fermentativo alcoólico e subsequente aumento da produtividade e menores custos operacionais (Kourkoutas et al., 2005).

### **Tipos de bioprocessos fermentativos empregados na fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis***

Pesquisadores vêm realizando estudos da tecnologia necessária para produção de álcool utilizando a cana-de-açúcar e seus resíduos, visando diminuir o custo de produção, otimizar as condições de bioconversão etanólica, e selecionar os microrganismos com maior produtividade de etanol (Tauk, 1976; Pereira Jr.; Menezes et al., 1998; Venturini-Filho; Cereda, 1998; Cabrini; Gallo, 1999; Ribeiro; Horii, 1999; Dutra et al., 2001; Ludwig; Oliveira-Neto, 2001; Laluce et al., 2002).

A produção de etanol pela bactéria *Zymomonas mobilis* por meio de diferentes regimes de cultivo tem sido descrita na literatura. Sem dúvida, os regimes de cultivo mais estudados são o descontínuo e o contínuo.



### Regime descontínuo

Os principais resultados em regime descontínuo encontrados na literatura, utilizando glicose como fonte de carbono, demonstram que, neste tipo de processo, apesar da inibição causada pela concentração de substrato, altas concentrações de etanol podem ser obtidas com *Zymomonas mobilis*.

Lee e colaboradores (1989) e Rogers e colaboradores (1982) em trabalho realizado com *Zymomonas mobilis* ZM4, utilizando diferentes concentrações iniciais de glicose, em regime descontínuo, observaram que a máxima velocidade específica de crescimento foi significativamente afetada pelo aumento da concentração de glicose. Nestes trabalhos, foi observado que concentrações iniciais de glicose maiores que 100 g/L reduziram consideravelmente a velocidade máxima específica de crescimento. No entanto, estes autores não observaram alteração das velocidades específicas de consumo de substrato ( $\cong 10 \text{ h}^{-1}$ ) e de produção de etanol ( $\cong 5 \text{ h}^{-1}$ ). Foi verificada ainda uma diminuição do fator de conversão de glicose em biomassa com o aumento da concentração inicial de glicose, mas este aumento não alterou o rendimento em etanol ( $\cong 95\%$ )

Segundo Rogers e colaboradores (1982), o rendimento em etanol normalmente é maior que 95%; o fator de conversão de glicose em biomassa varia de 0,015 a 0,050, dependendo da concentração inicial de substrato e a produtividade em torno de 5 a 7 g/L.h.

Silman (1984), trabalhando com fermentação em regime descontínuo alimentado, com a linhagem CP1, verificou que diferentes velocidades de alimentação do meio não influenciam significativamente o rendimento, a produtividade volumétrica e a concentração final de etanol. Este autor observou que, para a linhagem CP1, concentrações maiores que 8% (p/p) de glicose inicial resultaram em inibição pelo substrato. O processo foi, então, iniciado com 8% de glicose e o início da alimentação se deu após 4 horas, com o volume de alimentação correspondente a 36% do volume total do fermentador. A concentração de células obtida ao final do processo (21 a 29 horas) ficou em torno de 4,0 g/L e a produtividade em etanol de 4,6 a 5,2 g/L.h.

### Regime contínuo

Estudos conduzidos usando duas técnicas para o processo contínuo: o reciclo de células (Lawford; Rousseau, 2003) e o uso de células imobilizadas

(Amin; Khalaf; Allah, 1992) apresentaram excelentes resultados em laboratório, entretanto os mesmos autores observaram que o custo é excessivamente elevado para o uso em processos industriais.

Lawford e Rousseau (2003) demonstraram que, em cultivo contínuo de *Zymomonas mobilis* linhagem ATCC 39676, à medida que os valores de velocidade de duplicação foram elevados de 0,05 a 0,20 h<sup>-1</sup>, os valores de biomassa e etanol também aumentaram.

Hermans (1992), trabalhando com fermentação em regime contínuo, com a linhagem *Zymomonas mobilis* ATCC 29191, utilizando concentrações de glicose (150,0 170,0 e 200,0 g/L) obteve uma produtividade média de 4 g/L.h, com rendimentos em etanol em torno de 98% e velocidade específica de produção de aproximadamente 1,1 h<sup>-1</sup>.

Costa e colaboradores (2001) estudaram a fermentação contínua por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em concentrações elevadas de sacarose e concluíram que a melhor condição para fermentação de sacarose a 10% (p/v) mostrou ser na taxa de diluição de 0,21 h<sup>-1</sup>. Entretanto, para a fermentação de sacarose a 20% (p/v), mesmo em taxa de diluição baixa, a cultura mostrou um período prolongado de oscilações, indicando dificuldades, senão impossibilidade, em atingir o estado estacionário.

Segundo Ingram (1984), no Canadá, no Biohol, existe em funcionamento uma planta-piloto para a produção de etanol utilizando serragem hidrolisada por via ácida e fermentação por *Zymomonas mobilis* e no Japão, Austrália e Nova Zelândia existem várias plantas-piloto operando em sistema contínuo utilizando diferentes linhagens de *Zymomonas* para a produção de etanol. Segundo esses autores, este microrganismo pode ser especialmente útil em países como o Brasil e a Índia, levando em consideração a característica termotolerante de *Zymomonas mobilis*.

## **Fermentação alcoólica utilizando substratos alternativos de baixo custo comercial**

### **A matéria-prima utilizada na fermentação alcoólica**

Qualquer material vegetal que contenha açúcar ou carboidratos, de forma direta ou indireta, pode ser matéria-prima para obtenção de etanol, mas

para que haja viabilidade econômica é preciso considerar-se seu volume de produção, o rendimento industrial e o custo de fabricação; assim sendo, um substrato ou matéria-prima é considerada apropriada quando nestas estiverem incluídas nutrientes economicamente atraentes, não apenas do ponto de vista do valor comercial como um todo, mas também quanto aos custos de seu armazenamento, pré-tratamento, esterilização, processamento, entre outros (Aquarone et al., 1987; Greasham; Inamine, 1986).

Dada a importância dos carboidratos no metabolismo de qualquer via celular, não é por acaso que eles são a principal matéria-prima nas fermentações. Devem estar presentes compostos nitrogenados, além de pré-bióticos (fatores de crescimento), como vitaminas e coenzimas. Também é indispensável à presença de fósforo, sob a forma de fosfatos, o qual costuma ser adicionado aos meios, onde exerce ação tamponante ou inibidora de flutuações de pH (Tano; Buzato, 2003).

Recentes dados mostram que, atualmente, a produção fermentativa de etanol, a partir de recursos renováveis, tem recebido maior atenção por causa do aumento da escassez e elevados preços de mercado do petróleo (Gokhale; Sivaramakrishnan, 1986; Nigam, 1999; Amutha, Gunasekaran, 2001). O elemento chave no custo dominante da produção fermentativa de etanol combustível é o substrato/matéria-prima, embora alguns amidos fermentáveis e sacarose sejam facilmente obtidos de produtos agrícolas tais como mandioca e cana-de-açúcar, respectivamente.

A expansão de alternativas de uso de substratos de baixo valor oferece uma excelente perspectiva para a redução dos custos de produção e aumento da utilização do bioetanol, quer como aditivo ou combustível propriamente dito (Lee, 1997; Amutha; Gunasekaran, 2001).

Na obtenção de um produto biotecnológico, a matéria-prima pode representar até 75% do custo total de produção, o que tem determinado um crescente interesse no aproveitamento de resíduos agroindustriais e seus subprodutos como: o bagaço, melaço e vinhoto da cana-de-açúcar, o sacho de milho, o farelo de trigo e a palha de arroz. O interesse decorre do fato destas matérias-primas não possuírem custos de produção associados diretamente; sendo uma forma de agregar valor a resíduos que se formam em abundância, além de solucionar um sério problema ambiental para as indústrias que é o acúmulo desses resíduos (Cereda, 1994; Pereira Jr, 1999).

## Fermentação alcoólica utilizando substratos alternativos de baixo custo comercial por *Zymomonas mobilis*

Neste novo milênio, a sociedade tem se tornado mais consciente da necessidade de implementar tecnologias baseadas em matérias-primas renováveis e adequadas, tanto sob o ponto de vista energético, quanto o de preservação do meio ambiente. O domínio tecnológico na fabricação de produtos de baixo custo provenientes de matérias-primas e resíduos da agroindústria, com alto valor agregado como o álcool, é determinante para inserção de nosso país numa parcela significativa do mundo dos agronegócios.

Apesar dos inúmeros trabalhos realizados utilizando glicose como matéria-prima para a fermentação com *Zymomonas*, é evidente que a glicose como matéria-prima representa um custo muito elevado para fermentações industriais, tornando-se assim, importante investigar a produção de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de substratos baratos e disponíveis em grandes quantidades (Ernandes; Garcia-Cruz, 2011b).

Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas para aumentar o rendimento de etanol juntamente com o emprego de técnicas mais econômicas de produção, recuperação e purificação, visando diminuir o custo total do processo. Em nível experimental, o uso de diversas matérias-primas como substratos de baixo custo tais como sacarose, amido, amido hidrolisado, xarope de milho e melaços residuais da indústria açucareira têm sido pesquisadas para a produção de etanol por *Zymomonas mobilis*.

Millichip e Doelle (1989) utilizaram sorgo moído a seco como substrato para *Zymomonas* produzir álcool em larga escala (586.000 litros), obtendo 13% (v/v) de etanol. Além do sorgo, o milho e outras matérias-primas amiláceas foram testadas por Doelle e colaboradores (1989) para a fermentação em escala industrial (64.000 litros), utilizando um sistema de inóculo em cascata que substitui o sistema de recirculação de biomassa e, portanto, reduz os custos envolvidos em centrifugação e reciclo de células de *Zymomonas mobilis*.

Amin e Khalaf Allah (1992) testaram *Zymomonas mobilis* ATCC 396769 para fermentar pedaços de beterraba açucareira (185 g/L) em fermentação em estado sólido obtendo produtividade de 12 g/L.h e concentração de etanol de 130 g/L.

Park e Baratti (1993) utilizaram uma cepa osmotolerante (*Zymomonas mobilis* SBE15), mutante de *Zymomonas mobilis* ATCC 32821, para

fermentação de melaço de beterraba açucareira previamente hidrolisado enzimaticamente, em processo contínuo de dois estágios. O fermentador operou 18 dias, obtendo-se concentração de etanol de 60 g/L e 97% de conversão de açúcar.

Abaixo, segue-se uma descrição dos principais substratos que podem ser utilizados para a fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis*.

### **Cana-de-açúcar como matéria-prima na fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis***

Numa avaliação global do setor sucroalcooleiro brasileiro, verifica-se um subaproveitamento dos potenciais da cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar é uma planta da família das gramíneas (*Saccharum officinarum L.*) cultivada nas regiões tropicais e subtropicais e no Brasil, ela é a base para a produção de açúcar, álcool e outros subprodutos.

Seus principais constituintes estão indicados na Tabela 8.7. Entre as substâncias encontradas na cana-de-açúcar, a mais importante é a sacarose, que é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma de frutose. Além de etanol, da sacarose podem também ser produzidos, por rota química ou bioquímica, polióis, ácidos orgânicos, ésteres de sacarose, enzimas, biopolímeros, dentre outros.

Tabela 8.7 – Constituintes da cana-de-açúcar

Constituintes	Sólidos solúveis (%)
Açúcares	75-93
Sacarose	70-91
Glicose	02-04
Frutose	02-04
Sais	03-05
Ácidos orgânicos	1,5-4,5
Ácidos inorgânicos	1,0-3,0
Proteínas	0,5-0,6
Amido	0,001-0,05
Canas	0,3-0,6
Ceras e graxas	0,05-0,15
Corantes	03-05

Fonte: Caderno Copersucar (1988).

O mercado sucroalcooleiro movimentou cerca de R\$ 36 bilhões anualmente (Tabela 8.8), correspondendo ao notável valor de 3,5% do PIB brasileiro, com faturamentos diretos e indiretos nas 302 unidades produtoras (128 no estado de São Paulo), no ano de 2003 (*Jornal da Cana*, janeiro 2004). Este setor faz do Brasil o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, e o único país do mundo a implementar, em larga escala a produção de um combustível alternativo ao petróleo.

Atualmente, o álcool é reconhecido mundialmente por suas vantagens ambientais, sociais e econômicas, e os países desenvolvidos vêm investindo maciçamente na produção deste biocombustível, como é o caso dos Estados Unidos da América do Norte, Suécia e Canadá.

No Brasil, os estados de São Paulo, Alagoas, Pernambuco e Rio de Janeiro são os que mais se beneficiaram. O agronegócio brasileiro é responsável por 20,6% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro e gera 14% dos empregos totais do país. Aqui, destaca-se o agronegócio da cana-de-açúcar, que reúne 6% dos empregos agroindustriais brasileiros e é responsável por 35% do PIB e do emprego rural do estado de São Paulo.

De acordo com o Relatório de Produção Agrícola do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2007 a cultura da cana-de-açúcar cresceu 7% em relação ao ano anterior. Esse crescimento informa o IBGE, “é resultado do surgimento de novas áreas plantadas”. O estado de São Paulo, onde a produção de cana é mais relevante, responde por aproximadamente 57% de toda a produção nacional. De acordo com o relatório, em 2007, São Paulo deverá crescer 5,3% em relação ao obtido em 2006. Justifica-se esse incremento, sobretudo, pelo lado do consumo interno e pelas expectativas do crescimento da demanda do mercado mundial.

Uma vantagem importante do Brasil em relação às diversas economias mundiais é a abundância de terra agriculturável. São poucos os países em desenvolvimento que ainda possuem território rural a ser aproveitado em larga escala. Segundo os dados obtidos pela Unica, (União da Indústria Canavieira de São Paulo), a agricultura brasileira utiliza menos de 10% da superfície do país. A maior parte do território é ocupada por pastagens e engorda de animais (35%). As florestas correspondem a 55% e a cana-de-açúcar a 0,7%, com produção de 455 milhões de toneladas na safra em curso de 2006 e 2007, sendo recorde histórico.

A cana-de-açúcar pode ser uma fonte alternativa para a produção de etanol a um baixo custo por ser considerada abundante e de fácil disponibi-

lidade no país. Cada hectare de cana plantada produz de 50 a 100 toneladas de cana. A proporção do caldo de cana produzido é de 500 a 1.000 litros/tonelada de cana, média de 850 litros/ tonelada de cana, dependendo da embebição na moenda; 25 a 40 litros de melaço por tonelada de cana. Cada tonelada de cana produz cerca de 130 kg a 140 kg de açúcar (Unica).

A expansão da área plantada de cana-de-açúcar, entre 2000 e 2005, cresceu 14%, passando de 49 mil km<sup>2</sup> para 56 mil km<sup>2</sup>. Apesar de ainda estar concentrada no estado de São Paulo, a produção de cana-de-açúcar e álcool cresce rapidamente em outros estados. Em Minas Gerais, por exemplo, a produção de cana cresceu de 21,6 para 24,5 milhões de toneladas ou 13,5% entre as safras de 2005 e 2004 e de 2006 e 2005. De acordo com informações do Sindicato da Indústria do Açúcar (Sindaçúcar), em Minas Gerais, espera-se que a produção de cana-de-açúcar atinja 28,7 milhões de toneladas na safra de 2006 e 2007. Projeta-se que, até 2007, mais quatro usinas de açúcar, com investimentos estimados de R\$ 500 milhões, entrarão em operação no estado.

Pelas estimativas da Unica, a produção de cana-de-açúcar na Região Centro-Sul do país deverá atingir 375 milhões de toneladas na safra de 2006 e 2007, com crescimento de 11,3% em relação aos 336,8 milhões da safra de 2005 e 2006. Serão produzidas 25,5 milhões de toneladas de açúcar equivalente, com um aumento de 15,8% em comparação aos 22 milhões alcançados na safra do ano anterior. A produção de álcool anidro e hidratado deverá chegar a 15,6 bilhões no Centro-Sul do país, com uma elevação de 8,9% em relação à safra de 2005 e 2006.

O Brasil e os Estados Unidos são os líderes mundiais na produção de etanol, utilizando como matéria-prima o açúcar e milho, respectivamente. Apesar do incentivo à produção de etanol de milho nos EUA, apoiado por forças políticas, algumas associações de classe e inclusive o USDA (United States Department of Agriculture), cientistas da Universidade de Cornell e de Berkeley têm demonstrado que, tanto do aspecto energético como ambiental, a produção de etanol-milho não é racional. Além disso, é importante ressaltar para o fato que os custos de produção do álcool de cana são muito mais baratos do que os de milho (Andreoli, Souza, 2006). Na Tabela 8.8, encontram-se alguns parâmetros comparativos dos custos estimados de produção de etanol de milho nos Estados Unidos e de cana-de-açúcar no Brasil.

Tabela 8.8 – Sumário dos custos estimados de produção de etanol (U\$/ galão)

Item de custos	EUA Milho	EUA Cana	EUA Beterraba	EUA Melão	EUA Açúcar cru	EUA Açúcar refinado	Brasil Cana	Europa Beterraba
Matéria-prima	0,53	1,48	1,58	0,91	3,12	3,61	0,30	0,97
Processamento	0,52	0,92	0,77	0,36	0,36	0,36	0,51	1,92
Custo Total	1,05	2,40	1,35	1,27	3,48	3,97	0,81	2,89

Além dos fatores geográficos vantajosos para o plantio da cana-de-açúcar no Brasil, é importante ressaltar ainda que, por causa de sua composição química (compostos nitrogenados, vitaminas, coenzimas e açúcares fermentescíveis), alguns autores consideram-na como matéria-prima adequada para a fermentação alcoólica a partir de *Zymomonas mobilis* (Borsari et al., 2003).

### Caldo de cana-de-açúcar

Diante dos fatores geográficos vantajosos para o plantio da cana-de-açúcar no Brasil, justifica-se que o caldo da cana, obtido da cana-de-açúcar, destaca-se como uma fonte alternativa para a produção de etanol a um baixo custo por ser abundante e de fácil disponibilidade não só no país como na região de São José do Rio Preto, pertencente ao estado de São Paulo, e ainda, é considerada uma matéria-prima adequada para as fermentações com *Zymomonas mobilis* em virtude de sua composição química (alto teor de açúcares, nitrogênio, vitaminas e sais minerais) (Ernandes; Garcia-Cruz, 2010).

Conforme Luiz da Câmara Cascudo (1971), o caldo de cana (garapa) é um refresco cujo consumo há muito se universalizou no país, particularmente nas épocas de verão, fazendo parte também de uma diversidade de prescrições na medicina popular, como, por exemplo, acontece no Nordeste, onde se acredita que possua qualidade hemostática e cicatrizante e excelente galactogênio.

O caldo de cana é uma suspensão coloidal cuja cor, que varia de verde-escuro a marrom, resulta da presença de substâncias diversas, como clorofila, antocianinas, xantofilas e carotenos. Sua opacidade é causada por coloides, proteínas, pentosanas e sais inorgânicos como fosfatos, óxidos de cálcio, ferro e magnésio. Contém ainda terra, bagacilho e goma (Fioravanti, 2000; Kitoko et al., 2004).



O caldo de cana-de-açúcar comercial é uma matéria-prima consumida “*in natura*” no Brasil e é considerado de baixo custo comercial. Soccol e colaboradores (1990) relataram que a composição química do caldo de cana-de-açúcar apresenta: 74,5% a 82,0% de água; 14,0% de hidratos de carbono; 10,0% de fibras; 0,4% de substâncias nitrogenadas. As substâncias sólidas representam 18,0 a 25,0% do total de sua composição. A composição do caldo de cana-de-açúcar pode ser visualizada na Tabela 8.9.

Gunasekaran e colaboradores (1986) estudaram o efeito de diferentes meios (sintético, caldo e melaço de cana-de-açúcar) para a produção de etanol, com diferentes linhagens *Zymomonas mobilis* e os resultados obtidos estão representados na Tabela 8.10, onde pode ser observado que os melhores rendimentos foram obtidos com o caldo de cana-de-açúcar. Das linhagens testadas, apenas a NRRL B 4286 produziu mais etanol quando foi usado o meio sintético. Com *Zymomonas mobilis* ATTC 10988, o rendimento de etanol foi 82-94%, após 48 horas de fermentação.

Duarte (1995) analisou o efeito da lecitina de soja e do destilado do desodorizado do óleo de soja (DDOS) na fermentação da sacarose e do caldo de cana por *Saccharomyces cerevisiae* e por *Zymomonas mobilis* CP4 em cultura de batelada. Com o açúcar redutor total em valor nominal de 15%

Tabela 8.9 – Composição do caldo de cana-de-açúcar

Composição centesimal do caldo de cana-de-açúcar			
Elementos (%)		Porcentagem dos componentes	
Água	74,50	Sílica (SiO <sub>2</sub> )	0,25
		Potássio (K <sub>2</sub> O)	0,12
		Sódio (Na <sub>2</sub> O)	0,01
		Cálcio (CaO)	0,02
		Magnésio (MgO)	0,01
		Ferro (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	traços
Cinzas	0,50	Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0,07
		Sulfatos (SO <sub>3</sub> )	0,02
		Cloretos (Cl)	traços
		Celulose	5,50
Fibra	10,0	Sacarose	12,50
Matérias nitrogenadas	0,40	Ácido aspártico	0,20
		Ácido nítrico	0,01
Nitrogênio total	0,06%	Amoníaco	traços
		Corpos xânticos	traços

Fonte: Soccol e colaboradores (1990).

Tabela 8.10 – Efeito da concentração inicial de açúcar sobre a produção de etanol por várias linhagens de *Zymomonas mobilis*

Substrato	Parâmetros fermentativos	Linhagens			
		ATCC 10988	ATCC 12526	NRRL B 4286	IFO 13756
Meio sintético	P	5-9	6-1	10-15	8-85
	Açúcar inicial	46-09	20-0	89-0	20-0
	Su	0-32	75-0	20-0	69-14
	g/gs	73-0	47-65	79-29	0-39
	E	20-0	0-33	0-46	91-0
Cana-de-açúcar	P	10-3	10-3	9-2	10-3
	Açúcar inicial	18-0	18-0	18-0	89-4
	Su	89-4	89-4	79-86	97-2
	g/gs	0-48	0-48	0-42	0-47
	E	95-0	95-0	97-2	18-0
Melaço	P	3-05	2-9	3-29	1-97
	Açúcar inicial	10-0	10-0	10-0	10-0
	Su	ND	45-31	ND	ND
	g/gs	47-66	ND	51-41	30-78
	E	ND	ND	ND	ND

P – produtividade de álcool % (v/v); Su – substrato utilizado % (v/v); g/gs – gramas de álcool produzido/ g de substrato utilizado; E – porcentagem teórico de rendimento; ND – não determinado. Fonte: Gunasekaran e colaboradores (1986).

(p/v) e sem adição de suplemento lipídico, os açúcares não foram eficientemente utilizados e os resultados para *Saccharomyces* e *Zymomonas*, num meio contendo sacarose e caldo de cana foram, em média, respectivamente: eficiência de conversão (YE con.) 12,55 e 20,54%; taxa específica de crescimento máximo (Mmax.) 0,25 e 0,20 h<sup>-1</sup>. Com adição de lecitina de soja ou DDOS a 0,01% (v/v) em sacarose e caldo de cana-de-açúcar os resultados para *Saccharomyces* ou *Zymomonas* foram, em média, respectivamente: YE con. 13,69 e 26,15%, enquanto os valores de Mmax. foram: 0,24 e 0,22 h<sup>-1</sup> e Y<sub>x</sub>/s: 0,025 e 0,012.

Cação (1999) realizou um estudo utilizando o planejamento fatorial de 2 níveis equidistantes de 3 variáveis 23 para determinar as melhores condições de cultivo quanto a temperatura (25 e 35°C), agitação (0 e 150 rpm) e concentração de açúcares redutores totais no caldo de cana (100,0 e 200,0 g/L) e, 3 repetições no ponto central, onde a temperatura foi de 30°C, agitação de 150 rpm e concentração de açúcar redutor total no caldo de cana, usado como substrato para a produção de sorbitol e etanol, foi de 150,0 g/L. Observou-se que altas concentrações de açúcar no caldo de cana estimularam

a produção de sorbitol e etanol. Os cultivos estáticos proporcionaram os melhores valores de produção de sorbitol, porém, os melhores valores de etanol foram encontrados em cultivos com agitação de 150 rpm. Em relação às temperaturas testadas verificou que estas não foram uma variável significativa para a produção de sorbitol e etanol.

Tano e Buzato (2003) avaliaram a produção de etanol em caldo de cana fermentado por *Zymomonas mobilis* com alta concentração inicial de açúcar (150,0 g/L), rico em sais minerais, adicionado de 5,0 g de extrato de levedura e incubado a 28°C, durante 48 horas a 180 rpm, num pH de 5,4. Neste meio, observou-se a presença de etanol e foi constatado que este reduziu a formação de mais etanol, porém não afetou a produção de levana nem o coeficiente de produtividade, quando relacionado à biomassa (g biomassa/g açúcar consumido). Estes mesmos pesquisadores observaram que alguns dos componentes presentes no caldo de cana-de-açúcar inibem o crescimento e a fermentação por *Zymomonas mobilis*. Os níveis relativamente elevados de alguns sais inorgânicos, especialmente cloreto de potássio e alguns íons como cálcio e magnésio, apresentam um efeito inibidor significativo na fermentação, além da competição de outros microrganismos que progrediram nele.

Borsari (2004) estudou diferentes condições de fermentação por *Zymomonas mobilis* CP4, por meio de delineamentos estatísticos variando a concentração e tipo de substrato, forma de cultivo, suplementação com ácido pantotênico, extrato de levedura, cloreto de sódio e a técnica de permeabilização celular e observou que o caldo de cana-de-açúcar estimulou a produção de biomassa, sorbitol e etanol.

### **Melaços de cana-de-açúcar**

Segundo Resolução n.12 D.O. de 24/07/1978 do CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos) que estabeleceu os padrões de identidade e qualidade para os alimentos (e bebidas) em todo o território brasileiro, melaço é o líquido que se obtém como resíduo de fabricação do açúcar cristalizado, do melado ou do refino do açúcar bruto e deve ser designado com a denominação de “melaço” seguido do nome da substância de origem, como por exemplo, “melaço de cana”.

No Brasil, são produzidos cerca de 17,9 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar por ano durante a fabricação do açúcar. Por causa de sua

composição rica em açúcares fermentescíveis, seu baixo custo (R\$ 0,15/kg) e alta disponibilidade no território brasileiro, o melaço de cana-de-açúcar tem sido sugerido como substrato para melhorar e reduzir custos na produção de diversos produtos, como por exemplo, de ácido lático pelo *Lactobacillus curvatus* e para produção de etanol a partir de *Zymomonas mobilis* (Lima, 1975).

O melaço é um subproduto do processo de extração e refinação de sacarose, quer seja de cana ou beterraba, o qual pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de etanol por fermentação. O melaço de cana-de-açúcar caracteriza-se por apresentar maior conteúdo de vitaminas, ao passo que o melaço de beterraba é mais rico em nitrogênio e minerais. Ambos contêm aproximadamente 50% de açúcar, sendo a maior parte sacarose.

A composição média do melaço de cana-de-açúcar corresponde a 20% de água; 72% de constituintes orgânicos dos quais 62% correspondem aos açúcares (sacarose, glicose, frutose, ou açúcar invertido e rafinose), 10% de não açúcares (material nitrogenado, ácidos livres e combinados e substâncias gomosas solúveis) e 6% de constituintes inorgânicos (óxidos de silício, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro, fósforo e alumínio, além de resíduos de soda, carbonatos, sulfatos e cloretos) (Soccol et al., 1990).

A composição do melaço depende da variedade de cana-de-açúcar utilizada, portanto, fatores como: idade, limpeza, maturação, sistema de cultivo, adubação, tratamentos culturais e condições climáticas, além dos processos de fabricação normais utilizados nas diversas usinas conforme pode ser observado na Tabela 8.11.

Doelle e Greenfield (1985) detalharam ainda mais estes fatores que influenciam a composição do melaço, aos quais acrescentaram: natureza da matéria-prima (cana de açúcar, beterraba etc.); processo de extração do caldo; sistema de clarificação, evaporação e cozimento; sistema de resfriamento; sistema de turbinagem; tipo de açúcar e condições técnico-econômicas da região açucareira.

Segundo Kaseno e Kokugan, (1997), o melaço resultante da fabricação de álcool pode conter uma série de impurezas advindas de processos de caliação, sulfitação e fosfatação aplicados ao caldo de cana, os quais promovem a formação de um grupo (flocos) de precipitados de impurezas, estando neste incluídos os agentes de coloração (corantes) e ao se adotar este tipo de tratamento têm-se como resultado um licor negro (*black strap*) conten-

Tabela 8.11 – Variabilidade de composição do melão em Usinas de Açúcar

Elemento	Valores observados					
	São Paulo			Alagoas		
	Médio	Mínimo	Máximo	Médio	Mínimo	Máximo
Água (%)	17,3	8,2	26,8	–	–	–
Sólidos totais (%)	82,7	73,2	91,8	–	–	–
Brix (%)	80,0	65,0	88,0	78,61	76,77	83,30
Pureza (%)	65,0	56,0	76,0	46,54	40,41	55,67
Sacarose (%)	52,0	47,0	64,0	–	–	–
Glicose (%)	12,0	6,0	20,0	–	–	–
Frutose (%)	9,0	5,0	17,0	–	–	–
Açúcares redutores (%)	6,0	4,0	12,0	16,20	14,45	18,03
Açúcares totais (%)	65,6	52,1	72,1	54,73	51,11	61,09
Gomas (ppm)	–	0,0	2000	–	–	–
Ph	6,3	5,0	6,8	–	–	–
Cinzas (%)	5	3,5	7,0	–	–	–
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,05	0,01	0,15	0,07	0,02	0,14
K <sub>2</sub> O	2,1	1,23	2,68	3,51	2,93	4,52
CaO	0,36	0,14	0,73	1,36	0,93	2,03
MgO	0,12	0,03	0,60	1,03	0,60	1,31
SiO <sub>2</sub>	0,58	0,56	0,62	–	–	–
F <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,32	0,28	0,56	–	–	–
SO <sub>3</sub>	1,17	1,0	1,19	–	–	–
Cl	0,18	0,14	0,28	–	–	–
Na <sub>2</sub> O	0,12	0,11	0,19	–	–	–
Vitaminas A <sub>1</sub> , B <sub>1</sub> e B <sub>2</sub>	Variável	Variável	Variável	–	–	–

Fonte: Copersucar (1988).

do impurezas como sais inorgânicos, açúcares não fermentáveis, cinzas de sulfatos e corantes.

O melão contém uma série de impurezas como sais inorgânicos, cádmio, açúcares não fermentáveis e resíduos sulfatados, incluindo substâncias corantes; oriundas entre outros, do próprio tratamento aplicado à cana-de-açúcar na produção do açúcar e do solo onde esta foi cultivada e que interferem na produtividade em etanol e viabilidade celular dentro do bioprocessamento (Prado-Filho et al., 1998).

Além do melão de cana-de-açúcar existe também o melão de alta qualidade (HTM) que pode ser usado como substrato para produção de etanol. HTM é definido como um xarope clarificado, parcialmente invertido para evitar a cristalização e evaporado a 85° Brix. A composição do melão de alta qualidade difere notavelmente da composição do melão tradicional. Possui alto conteúdo de açúcares o que o faz muito interessante para a produção de álcool. O conteúdo de  $P_2O_5$ ,  $K_2O$ ,  $MgO$ ,  $CaO$  e nitrogênio é mínimo comparado com a do melão de cana e de beterraba (Cromie; Doelle, 1980).

Gunasekaran e colaboradores (1986) estudaram o efeito da adição de melão de cana-de-açúcar em meios de cultivo para a produção de etanol, com diferentes linhagens *Zymomonas mobilis*. As linhagens ATCC 10988 e (3,05% v/v) a NRRL B 4286 (3,29% v/v) mostraram máxima produtividade enquanto IFO 13756, mínima produtividade (1,97% v/v). A partir desses resultados, a *performance* de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 foi mais bem estudada em diferentes concentrações de açúcares presentes no melão de cana-de-açúcar. A máxima produção de etanol (3,35% v/v) foi com 15% de concentração inicial de açúcar e abaixo dessa concentração, a produção de etanol diminuiu significativamente. Em geral, os autores concluíram que a habilidade das linhagens de *Zymomonas mobilis* produzirem etanol a partir de melões foi menor quando comparada com os outros substratos (meio sintético e cana-de-açúcar).

### **Resíduos lignocelulósicos como matéria-prima na fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis***

Devemos lembrar que a produção mundial de etanol não é realizada com a mesma matéria-prima; para cada região existem peculiaridades geográficas a serem observadas, como é o caso do milho nos EUA, beterraba na Europa e a cana-de-açúcar no Brasil, México e Índia.

Há que se ressaltar que as matérias-primas de natureza lignocelulósica vêm ganhando cada vez mais atenção dos países avançados, verificando-se fortes investimentos em desenvolvimento tecnológico para o aproveitamento integral desses recursos abundantes em nosso planeta.

A importância do aproveitamento de resíduos lignocelulósicos (agroindustriais e florestais) se revela ainda quando identificamos grandes centros de pesquisa internacionais de elevada reputação dedicando-se exclusivamente ao tema (Chum; Overend, 2001; Mielenz, 2001; Pereira Jr., 2005).

Os resíduos lignocelulósicos são os materiais orgânicos mais abundantes da biosfera, representando aproximadamente 50% da biomassa vegetal e podem ser usados como matéria-prima em processos industriais para a produção de alimentos, combustíveis insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (Kadam; Forrest; Jacobson, 2000).

O Brasil, com sua grande extensão territorial, apresenta alto potencial de exploração de recursos renováveis para a geração de diversos insumos. Um resíduo abundante no país e proveniente de material renovável é o bagaço de cana-de-açúcar, pois o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo com uma produção estimada de aproximadamente de 570 milhões de toneladas referentes à safra dos anos 2008-2009, segundo dados da União da Indústria de Cana-de-açúcar (Unica) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa).

Uma indústria sucroalcooleira produz cerca de 280 kg de bagaço por tonelada de cana moída (Molina et al., 1995) o que corresponde a uma produção de bagaço de aproximadamente 100 milhões de toneladas por ano. Grande parte deste resíduo, também considerado por muitos como subproduto, é utilizada pela própria usina como fonte de energia.

Embora o bagaço possa ser utilizado para geração de energia ou como suplemento em ração animal, ainda há um grande excedente que poder utilizado para produção de diversos bens à sociedade. Algumas alternativas para sua utilização como matéria-prima são a produção de etanol, hidroximetilfurfural, papel e celulose, revestimentos acústicos, madeira prensada, álcool, alcaloides, enzimas e xilitol (Cunha et al., 2005).

Segundo Takahashi (1998), o etanol pode ser produzido a partir de resíduos lignocelulósicos. A hidrólise destes resíduos proporciona uma mistura de pentoses e hexoses, e a conversão completa destes açúcares em etanol é fundamental para que o preço do etanol produzido seja competitivo com o da gasolina. *Escherichia coli* KO11, possuindo os genes PDC (piruvato descarboxilase) e ADH (álcool desidrogenase) de *Zymomonas mobilis* inseridos em seu cromossomo, mostrou-se capaz de fermentar eficientemente pentoses e hexoses a etanol, em condições anaeróbicas. Em meio LB (Luria-Bertani), contendo extrato de levedura, peptona e NaCl, acrescido de 50 g/L de glicose, a bactéria produziu 21,1 g/L de etanol, equivalente a 82,2% do rendimento teórico máximo. Em meio LB acrescido de 40 g/L de xilose, produziu 16,3 g/L de etanol, o que corresponde a uma eficiência

de conversão de 80,2%. Em uma mistura de 10 g/L de glicose e 40 g/L de xilose, a bactéria recombinante produziu 24,5 g/L de etanol, com eficiência de 96,4%. No hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, os açúcares foram completamente consumidos em 48 horas e a eficiência de conversão foi de 95%. O meio “*corn steep powder*” (CSP), na concentração de 12,5 g/L, substituiu eficientemente o meio LB como fonte de nutrientes. O acetato, potencial inibidor do crescimento e do metabolismo de *E. coli*, está presente nos hidrolisados hemicelulósicos numa faixa de concentrações de 2,0 a 15,0 g/L. *E. coli* KO11 mostrou-se extremamente tolerante ao acetato. Em meio LB acrescido de glicose ou xilose mais acetato, foi observado que concentrações de 2,0 a 12,0 g/L não afetaram o desempenho fermentativo da bactéria. No entanto, foi verificado que todas as concentrações de acetato testadas (2,0 a 12,0 g/L) tiveram um efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano. Nos valores de pH mais baixos (5,5 e 6,0), a inibição foi exacerbada em função de maior concentração da forma protonada do ácido acético.

## O cenário futuro

Inquestionavelmente, o álcool é a melhor alternativa para substituir o petróleo nas próximas décadas em veículos automotores. A era do petróleo não vai se encerrar por falta de petróleo, mas porque o preço subirá tanto que será necessário desenvolver fontes alternativas, dentre elas, o etanol do milho ou da cana-de-açúcar.

O cenário futuro mostra que somente os maiores países consumidores de energia, Estados Unidos, Japão e Europa, vão precisar importar mais de 10 bilhões de litros de etanol até 2012. A Etanol-África anunciou o investimento de US\$ 1 bilhão para a produção de etanol na África do Sul. Se uma tonelada de cana produz 88 litros de etanol, seriam necessários mais de 110 milhões de toneladas de cana para atender o mercado futuro, o que acrescentaria mais 1,2 milhões de hectares a serem cultivados.

Em conjunto com o grande avanço da produção convencional de álcool no Brasil, conforme relatado anteriormente, a biotecnologia tem sido uma ferramenta bastante explorada para a obtenção de inúmeros produtos de interesse econômico e social. Os processos biotecnológicos têm se mostrados



promissores e com inúmeras vantagens em relação aos processos convencionais. Tal interesse pode ser justificado pelas condições de operações mais brandas empregadas na biossíntese, que reduzem o consumo de energia e aumentam a segurança do processo, pela alta especificidade das enzimas, que minimiza a formação de subprodutos e pelo menor impacto ambiental.

A crescente importância industrial dos métodos biológicos de produção deve, entretanto, ser acompanhada durante a produção de compostos. Assim, uma intensa e constante pesquisa visando entender melhor as vias metabólicas de síntese e a função fisiológica dos microrganismos produtores é necessária para regular a otimização do processo de fermentação alcoólica em escala industrial.

## Referências bibliográficas

- AKADA, R. Genetically modified industrial yeast ready for application. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.94, n.6, p.536-4, 2002.
- ALGAR, E. M.; SCOPES, R. K. Studies on cell-free metabolism: Ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*, v.2, p.275-87, 1985.
- AMIN, G.; KHALAF ALLAH, A.M. By-products formed during direct conversion of sugar beets to ethanol by *Zymomonas mobilis* in conventional submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, v.14, p.1187-92, 1992.
- AMUTHA, R.; GUNASEKARAN, P. Production of ethanol from liquefied cassava starch using co-immobilized cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.92, n.6, p.560-4, 2001.
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.87, p.214-7, 1999.
- ANDREOLI, C.; SOUZA, S. P. Cana-de-açúcar: a melhor alternativa para conversão da energia solar e fóssil em etanol. *Orplana – Organização de Plantadores de Cana da Região Centro Sul do Brasil*, Economia e Energia, São Paulo, ano 10, n.59, 2006.
- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Bicomcombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: maio 2011.
- ANFAVEA – Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. Vendas Atacado Mercado Interno por Tipo e Combustível Disponível em: <<http://www.anfavea.com.br/tabelas.html>>. Acesso em: maio 2011.
- AQUARONE, E. LIMA, U. A.; BORZANI, W. Biotecnologia, tecnologia das fermentações, 4 ed., São Paulo: Edgar Blucher, 285p.1987.
- BARROW, K. D. et al. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.20, p.22, 1984.

- BEKERS, M. et al. Sugar beet diffusion and syrup as media for ethanol and levan production by *Zymomonas mobilis*. *Food Biotechnology*, v.13, p.107-19, 1999.
- . The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *International Journal of Food Microbiology*, v.55, p.147-50, 2000.
- BELAICH, J. P.; SENEZ, J. C. Influence of aeration and of pentothenate on growth of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*, v.89, p.1195-200, 1965.
- BELLUCO, A. E. S. Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2001.
- BERTOLIN, T. E. et al. Influência de diferentes fontes de carbono na produção de gli-coamilase por fermentação semissólida. In: XVI Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1998a, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: SBCTA, 1998a. CD-ROM.
- . Estudo da hidrólise do amido de farelo de trigo via sistema submerso e semissólido In: Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 16, 1998b, Anais. Rio de Janeiro: SBCTA, 1998b. CD-ROM.
- BORREGO, F. et al. pH influence on ethanol production and retained biomass in a passively immobilized *Zymomonas mobilis* system. *Biotechnology Letters*, v.11, p.437-42, 1987.
- BORSARI, R. R. J. *Avaliação das diferentes condições de cultivo para a produção de levana por CP4*. 2004. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.
- BORSARI, R. R. J.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B. Produção de levana por *Zymomonas mobilis* em fermentação descontínua alimentada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, 2003, Florianópolis. Anais. Manaus: Polo Editora Ltda., 2003.
- BRAGA, V. S. *A influência da temperatura na condução de dois processos fermentativos para produção de cachaça*. 2006. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. *Plano Agrícola e Pecuário 2004/2005*. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em: mar. 2010.
- BRINGER, S. et al. Influence of ethanol on the hopanoid content and the fatty acid pattern in batch and continuous cultures of *Zymomonas mobilis*. *Archives Microbiology*, v.140, p.312-6, 1985.
- BUCHHOLZ, S. E.; DOOLEY, M. M.; EVELEIGH, D. E. *Zymomonas* – an alcoholic enigma. *Trends Biotechnology*, v.5, p.199-204, 1987.
- CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. A Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. *Scientia Agrícola*, v.56, n.1, p.105-12, 1999.
- CAÇÃO, S. M. B. *Fermentação de caldo de cana-de-açúcar por Zymomonas mobilis ATCC 29191 para produção de etanol e sorbitol*. 1999. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1999.

- CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M.; MORAIS, J. O. F. D. Effect of glucose concentrations, initial pH, and temperature on the alcoholic fermentation by *Zymomonas mobilis* ZAP. *Arquivos Biologia e Tecnologia*, v.32, p.439-55, 1990.
- CALAZANS, G. M. T. et al. The levan and ethanol production by *Zymomonas mobilis* strain ZAP in sucrose media. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v.32, p.631, 1989.
- CÂMARA CASCUDO, L. Da sociologia do açúcar: pesquisa e dedução. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Alcool, 1971.
- CAMPOS, I. *Revista ECO* 21, Ano 13, ed.80, jul. 2003.
- CAMPOS NETO, O. *Utilização dos Subprodutos da indústria Sucroalcooleira na Alimentação animal*. Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Campus de Botucatu, SP. 7p. 1986.
- CNNPA – COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS, APROVA Normas Técnicas Especiais, relativas a alimentos (e bebidas) para efeito em todo território brasileiro. CNNPA n.12 de 1978 D.O. 24.4.78. Disponível em <[http://www.engetecno.com.br/legislação/doces\\_melado\\_melão\\_rapadura.htm](http://www.engetecno.com.br/legislação/doces_melado_melão_rapadura.htm)>. Acesso em: dez. 2009.
- CAREY, W. C.; INGRAM, L. O. Lipid composition of *Zymomonas mobilis*: effects of ethanol and glucose. *Journal of Bacteriology*, v.154, p.1291-300, 1983.
- CARR, J. G. Genus *Zymomonas*. In: ———. *Bergey's: manual of determinative bacteriology*. 8.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974, p.8-21.
- CARR, J. G.; PASSMORE, S. M. Discovery of the “cider-sickness” bacterium *Zymomonas anaerobia* in apple pulp. *Journal of the Institute of Brewing*, v.77, p.462-6, 1971.
- CEREDA, M. P. *Resíduos da Industrialização da Mandioca no Brasil*. São Paulo: Pauliceia, 174 p.1994.
- CHUM, H. L.; OVEREND, R. P. Biomass and renewable fuels. *Technology*, v.71, p.187-95. 2001.
- COPERSUCAR. Fundamentos dos processos de fabricação de açúcar e álcool, *Caderno Copersucar*, Piracicaba, v.20, 1988.
- COSTA, F. H. N. et al. Fermentação contínua por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em concentrações elevadas de sacarose. *Semina: Ciências Exatas e Naturais*, v.3, p.201-7, 2001.
- CROMIE, S.; DOELLE, H. W. Relationship between maintenance energy requirements, mineral salts and efficiency of glucose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, v.2, p.357-62, 1980.
- . Nutritional effects on the kinetics of ethanol production from glucose by *Zymomonas mobilis*. *Eur. Journal Microbiology Biotechnology*, v.11, p.116-9, 1981.
- CUNHA, M. A. A. et al. Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.26, p.61-70, 2005.
- DADDS, M. J.; MARTIN, P. A. The genus *Zymomonas*: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, v.79, p.386-91, 1973.

- DAWES, E. A., LARGE, P. A. Effect of starvation on the viability and cellular constituents of *Zymomonas anaerobia* and *Zymomonas mobilis*. *Journal Gen. Microbiology*, v.60, p.31-42, 1970.
- DAWES, E.; RIBBONS, D. W.; REES, D. A. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. *Biochemical Journal*, v.98, p.804-12, 1966.
- DIEZ, M. C.; MANCILHA, I. M. Utilização de beterraba açucareira para obtenção de etanol via fermentação por *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces uvarum* IZ 1904. *Arquivos de Biologia Tecnologia*, v.33, p.915-24, 1990.
- DIEZ, M.C.; YOKOYA, F.; CARVALHO, P. R. Produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis*. *Arquivos de Biologia Tecnologia*, v.34, p.375-80, 1991.
- DiMARCO, A. A.; ROMANO, A. H. D-glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. *Applied Environ. Microbiology*, v.49, n.1, p.151-7, 1985.
- DOELLE, H.W; GREENFIELD. The productions of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.22, p.405-10, 1985.
- DOELLE, M. et al. Production of ethanol from corn using inoculum cascading of *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, v.15, p.137-40, 1989.
- DUARTE, J. C. Fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis* CP4 ou por *Saccharomyces cerevisiae* nos meios de sacarose e de caldo de cana-de-açúcar com ou sem suplementação lipídica. 1995. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1995.
- DUTRA, S. V. D; CARLOS E.; SOUZA, M. Aminoácidos livres e ureia durante a fermentação do mosto de *Carbenet Sauvignon* com diferentes leveduras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.19, n.2, p.101-6, 2001.
- ERNANDES, F. M. P. G. Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura sintéticos e um alternativo (caldo de cana-de-açúcar). 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.
- ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: Aspectos Tecnológicos, Características e Produção. *Semina: Ciências Agrárias*, v.26, p.15-9, 2005.
- \_\_\_\_\_. Análise dos parâmetros cinéticos para produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando fermentação submersa. *Acta Scientiarum*, v.31, p.35-41, 2009.
- \_\_\_\_\_. Influência da composição do meio para a produção de etanol, por *Zymomonas mobilis*. *Acta Scientiarum*, v.32, p.21-6, 2010.
- \_\_\_\_\_. Nutritional requirements of *Zymomonas mobilis* CCT 4494 for levan production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.54, n.3, p.589-600, 2011a.
- \_\_\_\_\_. Uso de caldo de cana-de-açúcar para produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, n.2, p.354-60, 2011b.
- FALCÃO DE MORAIS, J. O. Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana de fermentações industriais. *Revista de Microbiologia*, v.14, p.6-10, 1983a.
- \_\_\_\_\_. *Zymomonas mobilis* e seu possível emprego como agente de fermentação alcoólica. *Revista do Instituto de Antibióticos*, v.21, p.169-82, 1983b.

- FALCÃO DE MORAIS, J. O. et al. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. *Journal of Biotechnology*, v.31, p.75-91, 1993.
- FEIN, J. E. et al. Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, v.5, p.1-6, 1983.
- FIESCHKO, J.; HUMPHREY, A. Effects of temperature and ethanol concentration on the maintenance and yield coefficient of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Bio-engineering*, v.25, p.1655-60, 1983.
- FIORAVANTI, C. *Os arquitetos da nova cana*. Pesquisa Fapesp: São Paulo, p.29-35, 2000.
- GARCIA-CRUZ, C. H. Produção de polissacarídeos bacterianos. 1997. 63 f. Dissertação (Título de Livre Docente)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1997.
- GIBBS, M.; DEMOSS, R. D. Anaerobic dissimilation of C14, labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. *Journal of Biology Chemistry*, v.207, p.689-94, 1954.
- GOKHALE, D. V.; RAO, B. S.; SIVARAMAKRISHNAN, S. Alcohol dehydrogenase and invertase activities in ethanol tolerant yeasts. *Enzyme Microbiology Technology*, v.8, p.623-26, 1986.
- GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; LUCON, O. How adequate policies can push renewables. *Energy Policy*, v.32, p.1141-6, 2004.
- GONÇALVES DE LIMA, O. et al. Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife. *Revista do Instituto de Antibióticos*, v.10, p.3-15, 1970.
- GREASHAM, R.; INAMINE, E. Nutritional Improvement of Processes. In: DEMAIN, A. L.; SOLOMOM, N.A. (Eds.). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington: [s. ed.], v.4, p.41-8, 1986.
- GUNASEKARAN, P.; KARUNAKARAN, T.; KASTHURIBAI, M. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* strains on different substrates – a comparative study. *Journal Bioscience*, India, v.10, p.181-6, 1986.
- HERMANS, M. Untersuchungen zum einfluß von ethanol auf den Stoffwechsel von *Zymomonas mobilis*. Jülich: Institut für Biotechnologie. Forschungszentrum Jülich GmbH, p.1-117, 1992.
- HOPPNER, T. C.; DOELLE, H. W. Purification and kinetics characteristics of pyruvate decarboxile and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.17, p.152-7, 1983.
- INGRAM, L.O. Effects of alcohols on microorganisms. *Advance Microbiology and Physiology*, v.25, p.256-300, 1984.
- ISHIZAKI, A. et al. Ph-mediated control methods for continuous ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.77, p.541-7, 1994.
- JEREZ, M. C. D. *Estudo comparativo de diferentes métodos e condições de fermentação de melação de cana-de-açúcar por Zymomonas mobilis*. 1993.108 f. Dissertação

- ção (Doutorado em Ciência de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.
- KADAM, K. L.; FORREST, L. H.; JACOBSON, W. A. Rice straw as a lignocelulose resource: collection, processing, transportation, and environmental aspects. *Biomass and Bioenergy*, v.18, p.369-89, 2000.
- KANNAN, T. R.; MUKUNDAN, G. A.; GUNASEKARAN, P. Fermentation characteristics of levansucrase mutants of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.75, p.265-70, 1993.
- . Influence of intra and extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* on the ethanol production and by-product formation. *Biotechnology Letters*, v.19, p.661-4, 1997.
- KASENO; KOKUGAN, T. The effect of molasses pretreatment by ceramic microfiltration membrane on ethanol fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.83, n.6, p.577-82, 1997.
- KING, F. G.; HOSSAIN, M. A. The effect of temperature, pH and initial glucose concentration on the kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. *Biotechnology Letters*, v.8, p.531-6, 1982.
- KITOKO, P. M.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, M. L. Avaliação microbiológica do caldo de cana comercializado em Vitória, Espírito Santo, Brasil. *Higiene Alimentar*, v.18, p.73-7, 2004.
- KOURKOTAS, Y. et al. Effect of storage of immobilized cells at ambient temperature on volatile by-products during wine-making. *Journal of Food Engineering*, article in press Disponível: <[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)>. Acesso em: maio 2011.
- KLUYVER, A. J.; VAN NIEL, K. Prospects for a natural system of classification of bacteria. *Bacteriology*, v.94, p.369-403, 1936. Apud: SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, v.41, p.1-46, 1977.
- LALUCE, C. et al. Continuous ethanol production in a nonconventional five-stage system operating with yeast cell recycling at elevated temperatures. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, v.29, p.140-4, 2002.
- LAUDRINM J.; GOMA, G. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*: effect of temperature on cell growth, ethanol production and intracellular ethanol accumulation. *Biotechnology Letters*, v.4, p.537-42, 1982.
- LAWFORD, G. R.; ROUSSEAU, J.D. Cellulosic fuel ethanol: alternative fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.106, p.457-70, 2003.
- LAWFORD, G. R.; HOLLOWAY, O.; RUGGIERO, A. Effect of pH on growth and ethanol production by *Zymomonas*. *Biotechnology Letters*, v.10, p.808-14, 1988.
- LAWFORD, G. R. et al. *Zymomonas* ethanol fermentation: Biochemistry and bioengineering. In: The Royal Society of Canada Int. Symp. On ethanol from biomass. Canada, p.482-506, 1982.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, v.56, p.1-24, 1997.

- LEE, S., WROBLE, M.H., ROSS, J. T. L-asparaginase from *Erwinia carotovora*: an improved recovery and purification process using affinity chromatography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.22, p.223-45, 1989.
- LEHNINGER, A. L. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Edgard Bluncher, 2002.
- LIMA, U. de A. et al. *Biotechnology: tecnologia das fermentações*. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. v.1.
- . *Biotechnology industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- LINDNER, P. *Termobacterium mobilis*, ein mexikanisches Bakterium als neues Einsauerungsbakterium für Rubenschnitzel. Z. Ver. Dsch. Zucherind, v.81, p.25-36, 1931. Apud: SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, v.41, p.1-46, 1977.
- LOOS, H. et al. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: Evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. *Journal of Bacteriology*, v.176, p.7688-93, 1994.
- LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; DE ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia*, v.21, n.1, p.63-8, 2001.
- LYNESS, E. W.; DOELLE, H. W. Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, v.2, p.549-54, 1980.
- . Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, v.5, p.345-50, 1983.
- MACCARI JUNIOR, A. Uso da levedura amilolítica *Schwanniomyces castellii* para hidrólise do amido de batata e produção de etanol. Curitiba-Paraná: UFP, 1997. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, 1997.
- MENEZES, T. J. B.; SARMENTO, S. B. S.; DAIUTO, E. R. Fermentação da Mandioca: natural e acelerada por enzimas. In: XVI Congresso Brasileiro de Anais. Rio de Janeiro: Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1998. Rio de Janeiro. SBCTA, CDROM. 1998.
- MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*, v.4, p.324-9, 2001.
- MILLAR, D. G. et al. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnology Letters*, v.4, p.601-6, 1982.
- MILLICHIP, R.; DOELLE, H. M. Large-scale production from milo (Sorghum) using *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, v.8, p.141-5, 1989.
- MILLIS, N. F. A study of the cider-sickness *Bacillus*: a new variety of *Zymomonas* anaerobia. *Journal of General Microbiology*, v.15, p.521-8, 1956.
- MOLINA, J. W. F. et al. Aspectos econômicos e operacionais do enfardamento de resíduo de colheita de cana-de-açúcar para aproveitamento energético. *STA – Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v.13, p.28-31, 1995.
- MOREIRA, J. R.; GOLDEMBERG, J. The Alcohol Program. *Energy Policy*, v.27, n.4, p.229-45, 1999.

- NEGRÃO, L. C. P.; URBAN, M. L. P. Álcool como “commodity” internacional. *Economia & Energia*, n.47, ano 8, dez. 2004-jan. 2005.
- NIGAM, J. N. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste. *Journal of Biotechnology*, v.72, p.197-202, 1999.
- NIPKOW, A.; SONNLEITNER, B.; FIECHTER, A. Effect of carbon dioxide on growth of *Zymomonas mobilis* in continuous culture. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.21, p.287-91, 1985.
- OURISSON, G.; ALBRECHT, P.; ROHMER, M. Der mikrobielle Ursprung fossiler Brennstoffe. *Spektrum der Wissenschaften*, p.154-62, 1984.
- PANKOVA, L. M. et al. Effect of aeration on *Zymomonas mobilis* metabolism. *Microbiology*, v.54, p.120-3, 1985.
- PARK, S. C.; BARATTI, J. Effects of potassium chloride on ethanol production by an osmotolerant mutant of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.38, p.542-9, 1993.
- PARKER, C. et al. Kinetics of sugar transport and phosphorylations influence glucose and fructose cometabolism by *Zymomonas mobilis*. *Applied Environ. Microbiology*, v.63, p.3519-25, 1997.
- PEREIRA Jr., N.; BULLOCK, J. D. The ionic character of the environment in the flocculation of *Pichia stipitis*. *Revista de Microbiologia*, v.25, n.1, p.51-6, 1994.
- PEREIRA Jr., N.; BON, E. P. S. *Tecnologia Enzimática*. Rio de Janeiro: [s.ed.]. 1999. 109p.
- PRADO-FILHO, L. G.; DOMINGOS, R. N.; SILVA, S. M. G. Acúmulo de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae* fermentando mosto de melão. *Scientia Agrícola*, v.55, n.1, p.1-8, 1998.
- RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades. *Scientia Agrícola*, v.56, n.2, jun. 1999.
- RIBBONS, D. E.; DAWES, E. A.; REES, D. A. Levan formation by *Zymomonas mobilis*. *Journal Biochemical*, v.82, p.45, 1962.
- ROBINSON, D. S. Peroxidases and their significance in fruits and vegetables economic. *Microbiology. Microbial Enzymes and Bioconversions*, v.10, p.399-403, 1980.
- ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentration. *Biotechnology Letters*, v.1, p.165-70, 1979.
- ROGERS, P. et al. High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, v.15, p.7-11, 1980.
- . Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Advances in Biochemical Engineering*, v.23, p.37-84, 1982.
- . Recent developments in the *Zymomonas* process for ethanol production. *Biotechnology*, v.1, p.273-88, 1984.
- ROWE, E. S. Lipid chain length and temperature dependence of ethanol-phosphatidylcholine interactions. *Biochemistry*, v.22, p.3305-11, 1983.
- SANDES, A. R. R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Brasília, n.13, p.28-32, mar.-abr. 2000.



- SCHMIDT, A. et al. Effect of alcohol and temperature on the hopanoid content of *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.25, p.32-6, 1986.
- SHREVE, R. N.; BRINK Jr, J. A. *Indústrias de processos químicos*. 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1997.
- SILMAN, R. W. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in fed-batch fermentation. *Biotechnology Bioengineering*, v.26, p.247-51, 1984.
- SKOTNICKI, M. L. et al. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. *Applied Env. Microbiology*, v.41, p.889-93, 1981.
- SOCCOL, C. R.; SCHWAB, A.; KATAOKA, C. E. Avaliação microbiológica do caldo de cana na cidade de Curitiba. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento*, Curitiba, v.8, p.116-25, 1990.
- SOLS, A.; GONCEDO, C.; DE LA FUENTE, G. Energy yielding metabolism in yeast. In: Rose, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). *The Yeast*, Academic Press, Inc., 1971, p.271-307.
- SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters*, v.145, p.301-7, 1996.
- STOKES, H. W. et al. *Zymomonas*: the phantom ethanol proper. *Biosources Dig.*, v.3, p.124-32, 1981.
- STRUCH, T. et al. Osmotic adjustment of *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.34, p.518-23, 1991.
- SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, v.41, p.1-46, 1977.
- TAKAHASHI, C. M. Produção de etanol por *Escherichia coli* geneticamente modificada: influência de fatores nutricionais. 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Effect of the presence of initial ethanol on ethanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, p.242-4, 2003.
- TANO, M. S.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Sugar cane juice fermentation by *Zymomonas mobilis* CP4 subjected to inhibition by ethanol and high initial concentration of substrate. *Brazilian Archives Biology Technology*, v.43, p.425-30, 2000.
- TAUK, S. M. Estudo preliminar da vinhaça como substrato para leveduras. *Revista de Microbiologia*, v.7, n.4, p.92-7, 1976.
- TOMA, M. M. et al. The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. *Process Biochemistry*, v.38, p.1347-50, 2003.
- TORRES, F. A G.; MORAES, L. M. P. Proteínas Recombinantes Produzidas em Leveduras, *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.12, p.20-2, 2000.
- TOSTA, C. D. Biotipagem de leveduras industriais através do sistema killer: Dissertação (Mestrado em Ciência e Piracicaba-SP, Esalq-USP, 2004. Tecnologia de Alimentos. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 2004.

- UNICA – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. Ranking de Produção das Unidades do Estado de São Paulo, Safra 2008/2009. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica>>. Acesso em: abr. 2010.
- VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Hidrolisado de fécula de mandioca como adjunto de malte na fabricação de cerveja: avaliação química e sensorial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, p.54-61, 1998.
- VIIKARI, L. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.19, p.252-5, 1984.
- VIIKARI, L.; GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.23, p.240-4, 1986.
- WISBECK, E. et al. Evaluation of the flocculent strain *Zymomonas mobilis* Z1-81 for the production of sorbitol and gluconic acid. *Journal Basic of Microbiology*, v.6, p.445-9, 1997.



# Hidrólise enzimática na cadeia produtiva do bioetanol e uso de enzimas para diagnósticos de produtos da fermentação

*Edwil Aparecida de Lucca Gattás,  
Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro*

## Introdução

A Biotecnologia vem rompendo fronteiras propiciando grandes avanços em muitas áreas do conhecimento científico que tem se traduzido na melhoria da qualidade de vida da população. Entretanto, a utilização de técnicas que fazem parte desta área não é nova e vem sendo utilizada há muito tempo pela humanidade. Entre as inúmeras vantagens e tecnologias originadas nesse campo, podemos chamar atenção para a geração de produtos nas áreas farmacêutica, alimentar, ambiental, química e energética (Higgins, 1985). Sua importância vem sendo alicerçada desde seu início empírico, no qual o homem conseguia produzir por meio da fermentação produtos como pão, vinho, cerveja e mesmo pela modificação de alimentos como vinagre e queijos. A Biotecnologia ganhou sua magnitude quando os processos complexos começaram a assumir grande significado comercial, iniciado com a contribuição de Pasteur, no desenvolvimento da produção de diferentes solventes como etanol, acetona, butanol e na produção da penicilina pelo fungo *Penicillium chrysogenum* (Demain, 2007). De modo significativo nesse avanço, a produção de células de levedura também assumiu grande importância ao lado de sua inerente capacidade fermentativa para a produção de etanol. Em todas as fases desta evolução, muitos processos e procedimentos assumiram papel definitivo e, aliado principalmente às no-

vas tecnologias que surgiram na década de 1970, a Biotecnologia se consolidou utilizando o conhecimento acumulado e sendo capaz de gerar enorme riqueza e influência em cada setor da economia com destaque para a saúde, produção e processamento de alimentos, proteção ambiental e produção de materiais (Gavrilescu; Chisti, 2005). Dentro deste panorama, o Brasil tem adquirido competência indiscutível na área de produção de energia renovável como no caso do etanol a partir de cana-de-açúcar (Goldemberg, 2008).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) representa alimento e energia para o setor industrial; e a geração de bioetanol tem avançado produzindo conhecimento em áreas diversas (DeVries et al., 2010; Gálvez, 2000). Hoje a produção de bioetanol está operando com leveduras selecionadas que imprimem rendimento na fermentação de 91,5% e viabilidade final da ordem de 97%. Estes números representam aumentos de 37% em relação à manutenção da viabilidade e, da ordem de 4% em relação ao rendimento, quando comparados com processos de produção de etanol combustível, que utilizavam leveduras de panificação. Atualmente, o Brasil é o maior detentor de conhecimento e tecnologia na geração de etanol combustível a partir da cana-de-açúcar. O etanol, um combustível menos poluente que os derivados de petróleo, assume importante papel no processo de contenção do aquecimento do planeta. A otimização de seu processo de produção, o desenvolvimento de novas variedades de leveduras e o aproveitamento de outros materiais para geração de fontes alternativas de carbono, constitui alvo para diversos estudos (Amorin, 2005).

Na produção de etanol, o bagaço da cana-de-açúcar vem sendo utilizado para geração de vapor e eletricidade. O resíduo queimado representa um processo tradicional de baixa eficiência quanto à quantidade de energia gerada e, portanto têm sido buscadas novas aplicações já que ele possui alto teor de carboidrato e relativamente baixo teor de lignina. Esta técnica da produção de etanol utilizando-se de subprodutos industriais que contêm lignocelulose como bagaço de cana-de-açúcar vem sendo explorada há algum tempo (Dale et al., 1984; Wright, 1998; Azzam, 1989; Cadoche; Lopez, 1989; Reshamwala et al., 1995; Bjerre et al., 1996; Duff; Murray, 1996; Martín, 2002; Sun; Cheng, 2002; Vasques et al. 2007; Ojeda; Kafarov, 2009; Balat, 2011; El-Zawawy et al., 2011). Nesse processo, o bagaço é submetido a um tratamento ácido, que após a prensagem, segue duas rotas: a parte líquida vai para a fermentação gerando etanol e a sólida deve ser

submetida à deslignificação. Após a remoção da lignina, a parte celulósica restante pode ser fermentada com enzimas celulolíticas, que irão liberar açúcares, dos quais a levedura produzirá etanol. O etanol celulósico, que pode ser considerado como aquele obtido a partir da quebra de resíduos celulósicos como bagaço de cana, bagaço e palha de milho, através de diferentes tecnologias incluindo enzimas, tem um impacto positivo sobre o meio ambiente no sentido de redução de CO<sub>2</sub> gerado em torno de 65-95% em comparação ao uso de gasolina como combustível. Assim, podemos considerar como um dos pontos importantes a hidrólise enzimática, uma tecnologia que resulta na utilização destes substratos ricos em celulose que irá contribuir para utilização de uma fonte de energia mais limpa em relação ao meio ambiente (Solomon et al., 2007).

No Brasil, as fontes de matéria-prima de celulose são os subprodutos da produção de cana-de-açúcar: a palha, que fica no campo após a colheita, e o bagaço da cana, resultante do processo convencional de produção de açúcar e etanol nas usinas (Bastos, 2007). A quebra da celulose é realizada por enzimas como celulases, xilanases e enzimas acessórias produzidas durante a fermentação nos processos de fermentação desses microrganismos, que podem auxiliar a degradação de fibras celulósicas presentes no bagaço de cana podendo gerar, deste modo, etanol. Uma grande atração para a utilização de enzimas em processos biotecnológicos reside no fato de que enzimas são macromoléculas catalisadoras de reações químicas, presentes em todos os seres vivos, dos quais podem ser extraídas e aplicadas, livres ou imobilizadas, em sistemas diferentes daqueles que as originou (Said; Pietro, 2004).

Na hidrólise enzimática da celulose, as enzimas celulolíticas assumem grande importância e muitos microrganismos são capazes de produzir enzimas celulolíticas entre os quais podemos citar as bactérias aeróbicas, nas quais encontramos o gênero dos Actinomicetos e dentro destes especialmente *Streptomyces* sp. Ainda são consideradas boas produtoras de enzimas celulolíticas *Celulomonas* sp. e *Bacillus* sp. Entre as bactérias anaeróbicas são encontrados *Clostridium* e *Bacterioides*. Numerosos fungos são considerados bons produtores de enzimas celulolíticas como, por exemplo, *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Bisaria, 1991; Sternberg, 1976; Fan et al., 1987; Pentilla et al., 1987; Duff; Murray, 1996).

A celulase, ou complexo celulolítico secretado por fungos filamentosos, é formada por três componentes enzimáticos majoritários, as endo-

glucanases (EG; EC 3.2.1.4), as celobioidrolases (CBH; EC 3.2.1.91) e as  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21). Essas enzimas atuam em cooperação, ou seja, as endoglucanases (EG) clivam randomicamente ao longo da cadeia de celulose, produzindo novos sítios de ataque para as celobioidrolases; as celobioidrolases (CBH) agem como exoenzimas, isto é, nas extremidades das cadeias, e liberam celobiose como produto principal; e as  $\beta$ -glicosidases completam o processo pela hidrólise da celobiose e de outros oligossacarídeos até a geração final de glicose (Whitaker, 1971; Pentilla et al., 1987; Beguin; Aubert, 1994; Persson et al., 1991; Jiang et al., 2011; Chandra et al., 2009).

As celulases quebram a celulose em açúcares simples, que servem como fonte de carbono e energia para os microrganismos. A busca atual da ciência está em encontrar e desenvolver enzimas que possam atender às necessidades industriais, isto é, enzimas estáveis e que não sejam inibidas pelos produtos de hidrólise. Muitas tentativas foram feitas para determinar a natureza das características do substrato, que levam à diminuição da taxa de hidrólise da celulose (Mooney et al., 1998; Ramos et al., 1993; Grethlein, 1985). A hidrólise enzimática da celulose em açúcares solúveis tem sido estudada extensivamente para utilização de parede celular vegetal como substrato nos processos de produção de bioenergia (Tomme et al., 1995; Duff; Murray, 1996). De interesse central atualmente é o desenvolvimento de um processo eficaz para conversão da celulose em etanol para uso como combustível. No entanto, apesar dos esforços de pesquisa intensiva, a conversão rápida de substratos de celulose por hidrólise enzimática é ainda de difícil obtenção.

Diversos fatores impedem a utilização eficaz de matérias-primas de lignocelulose em processo de geração de bioetanol. A velocidade de reação diminui rapidamente durante a realização da hidrólise, e pode levar a uma diminuição da produção e nos longos tempos de processo (Gregg; Saddler 1996). Altas concentrações de enzimas são necessárias para atingir a conversão de celulose, e a reciclagem das mesmas é difícil por causa da adsorção na lignocelulose residual (Gregg; Saddler 1996). Alguns estudos têm demonstrado que a superfície da celulose tem importância na velocidade inicial de hidrólise (Grethlein, 1985; Thompson; Chen H-C, 1992). A celulose apresenta regiões cristalinas com cadeias paralelas firmemente unidas por ligações de hidrogênio. Tem sido sugerido que as partes cris-

talinas do substrato devem tornar a celulose menos acessível às enzimas, o que poderia explicar a observação de que substratos cristalinos são mais resistentes à degradação enzimática em comparação com substratos mais amorfos (Fan et al., 1980). No entanto, há também relatos de que o grau de cristalinidade não é significativamente alterado ao longo do tempo de hidrólise prolongada (Lenz et al., 1990). Alguns estudos fornecem como sugestão que a lignina presente em substratos complexos, tais como madeira, especialmente madeiras macias, tratada por explosão a vapor poderiam ter um efeito negativo sobre a reação de hidrólise (Mooney et al., 1998).

Tratamentos químicos seguidos pela utilização de enzimas celulolíticas encarecem a produção de etanol em até 40% por causa do alto preço dessas proteínas. Uma solução para a viabilidade da realização da técnica em escala industrial seria a produção dessas enzimas com custo relativamente mais baixo (Gabhane et al., 2011).

Estudos de otimização na produção e utilização de enzimas celulolíticas produzidas a partir de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* mostraram resultados satisfatórios, com custos médios de produção até 200% menores que as disponíveis no mercado. Quando essas enzimas são utilizadas na etapa de produção de açúcares a partir dos resíduos de celulose, implicar-se-á uma diminuição significativa do custo final do etanol (Pal; Khanum, 2011; Ahamed; Vermette, 2008; Fang et al., 2010; Mekala et al., 2008).

O aumento de estudos nestas áreas tem gerado maior conhecimento sobre a atuação das enzimas e, conseqüentemente, pode determinar efetivamente sua utilização. Assim, por exemplo, os estudos de processos de fermentação para produção de enzimas têm fornecido cada vez maior quantidade dessas proteínas por meio de processos biotecnológicos. Além do conhecimento adquirido, estes estudos devem levar a diversas aplicações, por exemplo, na extração de óleos essenciais que são utilizados pela indústria farmacêutica e/ou de alimentos.

Neste sentido, experimentos de aumento do rendimento de extração de óleos essenciais de *Melampodium divaricatum* e *Mentha spicata* realizados com as enzimas celulolíticas e xilanolíticas produzidas por fungos como *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* demonstraram a eficácia da utilização destas enzimas, com um aumento médio de 60% da produção de óleo para *M. divaricatum* e 55% para a *M. spicata*, em relação à extração sem a aplicação das enzimas (Santos, 2008).



A análise por cromatografia gasosa dos óleos extraídos de *M. spicata* na presença ou ausência de enzimas mostrou, para esta espécie, que a carvona foi o composto majoritário com uma concentração de 59,12% do óleo extraído sem tratamento enzimático e 55,36% no óleo extraído com tratamento enzimático. Para a *M. divaricatum*, o composto majoritário foi o transcariofileno, contribuindo com 48,59% do óleo nas partes aéreas secas. No óleo extraído das partes aéreas frescas, com e sem tratamento enzimático, este composto contribuiu com valores menores: 36,78 e 39,94%, respectivamente. Os óleos obtidos, avaliados por cromatografia gasosa não demonstraram alterações significativas no teor de seus componentes com o uso de enzimas sugerindo que sua aplicação pode auxiliar nos rendimentos de extração. Isso pode representar um grande aliado para obtenção de maiores rendimentos de óleos que possam estar presentes em algumas espécies vegetais em baixas concentrações, mas que representem importante matéria-prima para a indústria farmacêutica ou de alimentos (Santos, 2008). Outra aplicação viável das enzimas seria na geração de kits enzimáticos para determinação de produtos e subprodutos de fermentação.

A produção de biodiesel, alternativa de combustível renovável, tem mostrado preocupação com a geração de subprodutos, principalmente o glicerol bruto (Lin et al., 2009). Estratégias biotecnológicas visando à utilização do glicerol como fonte de carbono para obtenção de produtos de maior valor agregado têm estimulado pesquisas na área. A dosagem da concentração de glicerol é uma importante ferramenta para o acompanhamento do rendimento na produção de biodiesel. O glicerol, também conhecido como glicerina, resultante da reação de transesterificação de óleos vegetais, apresenta concentração muito variável conforme a eficiência da reação. Sua determinação por meio de um método econômico e rápido é de interesse para as indústrias de bioetanol e biodiesel.

Outras aplicações industriais de leveduras incluem a produção de proteínas, nucleotídeos, vitaminas, glicoproteínas, coenzimas, lipídeos etc. Com o desenvolvimento das novas técnicas moleculares, principalmente aquelas relativas à engenharia genética, as leveduras, em especial a do gênero *Pichia pastoris* foram transformadas e utilizadas como produtoras de proteínas heterólogas (Creeg et al., 1993) e utilizada também, por meio da engenharia metabólica, para melhorar a eficiência de conversão de substratos em produtos de interesse biotecnológico (Ostergaard et al., 2000).

A utilização de enzimas em métodos analíticos para análises tem como resultados economia, precisão, facilidade de manuseio e rapidez nas respostas. Os *kits* enzimáticos têm aplicações no controle de qualidade na indústria de bebidas e combustíveis (bioetanol e biodiesel).

## Utilização de enzimas em métodos analíticos

Alguns métodos para análises em laboratórios clínicos compreendem reações de oxidação, esterificação, formação de éter, desidratação e procedimentos cromatográficos. As determinações enzimáticas, utilizando as oxidorredutases são as que apresentam maior sensibilidade e especificidade.

As oxidorredutases, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Celular (IUBMB) são uma categoria de enzimas responsáveis pela catálise de reações de oxidação e/ou redução de substratos, ou seja, participam de reações em que há transferência de elétrons entre espécies químicas. O substrato oxidado (agente redutor) é considerado doador de hidrogênio ou elétron, enquanto aquele que foi reduzido (agente oxidante) é denominado receptor (IUBMB, 1992; Devaux-Basséguy et al., 1997).

A nomenclatura adotada para as oxidorredutases baseia-se na estrutura: *doador: receptor oxidorredutase* (nome sistemático). As oxidorredutases são subdivididas em quatro tipos principais (Dixon; Webb, 1979; IUBMB, 1992):

- Desidrogenases: catalisam a transferência de hidrogênio do substrato ao cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>);
- Oxidases: catalisam a transferência de hidrogênio do substrato para o oxigênio molecular (espécie receptora) produzindo peróxido de hidrogênio como subproduto;
- Peroxidases: catalisam a oxidação do substrato pelo peróxido de hidrogênio;
- Oxigenases: catalisam a oxidação do substrato pelo oxigênio molecular, produzindo água como produto reduzido.

A utilização de diferentes oxidorredutases em métodos analíticos e ensaios de validação dos mesmos são descritos neste capítulo.

A validação de um método analítico de dosagem deve atingir alguns critérios que são descritos como especificidade, seletividade, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, exatidão, linearidade, limite de detecção etc. (Anderson; Ngeh-Ngwinbi, 1995).

A seletividade e a especificidade de um método estão relacionadas com a capacidade de realizar o teste na presença de interferentes. Os *kits* comerciais utilizam enzimas altamente purificadas, fato que exclui a ocorrência das reações paralelas dos interferentes, presentes nas amostras biológicas (Boehringer Mannheim, 1997). Diluições das preparações enzimáticas parcialmente purificadas possibilitam o uso de enzimas em métodos analíticos de dosagens, e a ação dos interferentes é minimizada pelas diluições tanto da preparação enzimática como da amostra a ser quantificada. A precisão em um método analítico se mede pela concordância entre muitas determinações analisadas e é expressa pelo desvio padrão. A precisão é variável conforme a amostra. Para amostras de alimentos pode ser considerado o intervalo compreendido entre 2 - 20% no desvio padrão.

Quando se deseja comprovar a repetibilidade de um método, realiza-se um grande número de análises num único laboratório, já a reprodutibilidade, necessita que as análises sejam feitas em diferentes laboratórios.

Estudo de recuperação de algum componente da amostra está relacionado com a acuidade do método. Estes estudos são realizados comparativamente, analisando-se a amostra-teste e uma solução-padrão contendo a substância de concentração conhecida. A solução original utilizada para preparo do padrão não necessariamente deve apresentar grau extremo de pureza (Zanon, 2007). Portanto, exatidão e a recuperação podem ser analisadas conjuntamente, uma vez que a exatidão é medida pela concordância com os valores da referência, podendo ser recuperada com a adição de quantidade da substância conhecida e analisada na amostra.

A resposta de um método pode ser medida como função do aumento da concentração da substância analisada. Na menor concentração da substância, as leituras das análises podem conter o ruído do aparelho de quantificação, ao passo que, no outro extremo, pode haver fuga da linearidade na curva analítica. O intervalo linear, compreendido entre o limite máximo e o mínimo é considerado para efeito dos cálculos de concentração.

A linearidade da curva de calibração possibilita o cálculo direto da quantidade da substância na amostra, naquele intervalo, com aplicação

da equação de regressão linear e seu intercepto próximo do zero. A faixa de dosagem indica o intervalo entre os níveis superior e inferior que tenha precisão, exatidão e linearidade do método, já o limite de detecção e o limite de quantificação dependem do equipamento usado e das condições dos cálculos (Camargo et al., 2007). A revalidação do método também é citada por alguns autores (Driffield et al., 2007; Zanon, 2007) e as faixas operacionais devem ser definidas para cada método, baseadas na comparação com outros métodos semelhantes.

A dosagem do etanol e glicerol durante a produção de combustíveis tem se mostrado importante para o aumento de rendimento do processo e qualidade do produto. Embora existam vários métodos de dosagens, os enzimáticos são os mais interessantes por serem rápidos, precisos, de fácil manuseio e baixo custo.

Ensaio de produtos e subprodutos de fermentação, utilizando enzimas, podem derivar para diversas leituras, tais como: bioluminescência (Eggstein; Kuhlmann, 1962; Kahle; Tesarich, 1980), cromatográficas (Pecina et al., 1984; Prablu; Baldwin, 1990; Hamano et al., 1991; Kobasyashi; Kawai, 1982), fluorimétricas (Carlson; Wadstrom, 1959; Compton; Purdy, 1980; Bergmeyer, 1983; Wang et al., 1993; Fossati et al., 1992; Wimmer et al., 1986), amperométricas (Wimmer, et al., 1985) etc. Os métodos enzimáticos, com leituras espectrofotométricas na região do visível são os menos complexos no preparo das amostras e utilização do equipamento. Várias citações na literatura utilizam reações de formação de água oxigenada acoplada à reação com peroxidase e determinadas por diferentes técnicas (Ince et al., 1987; Laurell; Tibbling, 1966; Léric et al., 1970; Lim; Buttery, 1977).

## **Alguns exemplos de aplicações das enzimas na montagem de métodos analíticos**

### **Enzimas extraídas de *Saccharomyces cerevisiae***

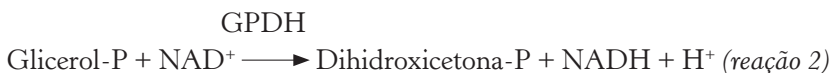
A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é vendida no comércio como fermento de pão e comercializada de duas formas: úmida e seca. Na primeira, a torta de leveduras, procedente do filtro rotatório é empacotada, e sua preservação necessita de refrigeração. A vida útil deste produto é de aproximadamente três semanas. Na segunda, a secagem da levedura é feita a vácuo

numa temperatura de 55°C, e permanece ativa por um ano à temperatura ambiente. Métodos analíticos de dosagens podem ser desenvolvidos usando levedura seca comercial como fonte de glicerol 3 fosfato desidrogenase e glicerol quinase, necessitando tratamento prévio de ruptura das células para extração das enzimas.

As desidrogenases são amplamente utilizadas nos ensaios analíticos de compostos de interesse industrial, incluindo glicerol e etanol. São enzimas que necessitam da coenzima NAD<sup>+</sup> na reação e podem ser acompanhadas pela quantidade de NADH gerado, pela leitura espectrofométrica a 340 nm (leitura na região do ultravioleta). Outro método analítico de dosagem de glicerol, envolvendo as enzimas, glicerol quinase e glicerol 3-fosfato oxidase, (GPO; EC 1.1.3.21) além das peroxidases (PO; EC 1.11.1.7) utiliza leitura espectrofotométrica a 540 nm (leitura na região do visível).

Tininis (2000) estudando uma preparação enzimática, obtida a partir de levedura de panificação contendo as enzimas glicerol quinase (GK) e glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH), determinou a concentração de glicerol em diferentes amostras. O método de dosagem de glicerol foi sensível na faixa de 6,64 a 27,02 x 10<sup>-3</sup> g/l de glicerol presente em bebidas e caldos fermentados de destilaria, mostrando reprodutibilidade analítica e baixo custo (Tininis, 2000).

A dosagem enzimática do glicerol, por meio das leituras a 340 nm foi descrita por Wieland (1962), e envolve duas reações: na primeira, o substrato glicerol é fosforilado a glicerol fosfato na presença de ATP e glicerol quinase (EC 2.7.1.30). Na segunda reação, glicerol fosfato é transformado em diidroxicetona fosfato por ação da glicerol-3-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.8) na presença de NAD<sup>+</sup> e hidrato de hidrazina, em condições de pH básico, conforme as reações:



Outro método analítico de dosagem com leitura na região do ultravioleta objetiva o ensaio do etanol. O ensaio enzimático do etanol utiliza álcool

desidrogenase (ADH; EC 1.1.1.1). Álcool desidrogenase, uma oxidorreductase, presente em tecido animal, plantas e microrganismos, acelera a reação de óxido-redução de transformação do etanol em acetaldeído na presença de  $\text{NAD}^+$ , descrita por Bonnichsen (1965). A reação ocorre em pH 8,8 com o equilíbrio deslocado para a formação do acetaldeído pela reação com semicarbazida, conforme:



O método apresenta sensibilidade na faixa de 5  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$  no tubo de dosagem, o que equivale a soluções-padrão do etanol na faixa de 74,54 x 10<sup>-4</sup> g/L a 298,08 x 10<sup>-4</sup> g/L. A concentração do etanol foi determinada em amostras de diferentes bebidas comerciais (Zanon, 2006). A análise de etanol pelas leituras espectrofotométricas na região do visível necessita de reação prévia com reagente que confere cor, como sal de tetrazólio. A curva analítica de dosagem do etanol apresentou linearidade e coeficiente de correlação no valor de 0,998. A enzima mostrou estabilidade em diferentes temperaturas por até 12 meses. Ensaio de estocagem da ADH demonstraram que, na presença de 15% (p/v) de polietilenoglicol (peso molecular 3350), ou 1,0 mM de azida de sódio, a atividade da enzima foi mais estável por maior período de tempo (Zanon et al., 2007).

O método colorimétrico para determinação de etanol, baseado na redução do sal de tetrazólio e leituras espectrofotométricas, mostrou eficiência em termos de rapidez, simplicidade, sensibilidade e baixo custo e sensibilidade na faixa compreendida entre 4,6 x 10<sup>-2</sup> - 23,0 x 10<sup>-2</sup> g/L de etanol. As determinações do conteúdo alcoólico de diversas bebidas fermentadas (Tabela 9.1) foram examinadas utilizando o método padronizado.

Tabela 9.1 – Ensaio de etanol em bebidas utilizando metodologia colorimétrica

Amostra	Referência (% vol.)	Analisado (% vol.)
Uísque	40,0	37,6 ± 1,0 (94,0%)
Aguardente	39,0	36,3 ± 0,5 (93,1%)
Rum	38,0	36,3 ± 0,5 (95,5%)
Vinho branco	10,2	10,7 ± 0,4 (104,9%)
Vinho do Porto	19,5	19,2 ± 1,0 (98,5%)

## **Enzimas glicerol quinase e glicerol fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* expressas na levedura *Pichia pastoris***

A levedura *Pichia pastoris* vem sendo largamente utilizada como um eficiente sistema de expressão para a produção de proteínas heterólogas, pois é um sistema seguro, fácil e gera altos níveis de expressão proteica.<sup>1</sup>

A levedura *P. pastoris* apresenta duas características que a tornam uma hospedeira ideal para a produção de proteínas heterólogas. A primeira é o forte promotor usado para transcrever genes heterólogos, o qual é derivado do gene da enzima álcool oxidase (AOX1). Esse promotor é regulado transcricionalmente por metanol, um indutor relativamente barato. Em células expostas a metanol como única fonte de carbono, o início da transcrição no promotor AOX1 é altamente eficiente e comparável aos promotores derivados dos genes altamente expressos da via glicolítica. No entanto, ao contrário dos promotores glicolíticos, o promotor AOX1 é firmemente regulado e reprimido sob condições de crescimento sem metanol. A maioria das proteínas heterólogas é deletéria para a célula, quando expressas em altos níveis, portanto, a habilidade de manter a cultura em um estado reprimido ou desligado é altamente desejável. Além de metanol, o sistema AOX1 necessita da ausência de glicose para ser plenamente ativado. Uma vez que o promotor AOX1 é controlado pela manipulação da fonte de carbono adicionado ao meio de cultura, o crescimento e a indução de cepas de *P. pastoris*, que expressam proteínas heterólogas, são facilmente obtidos em todas as escalas, desde frascos até grandes fermentadores.

A segunda característica importante da *P. pastoris* é que esta levedura não realiza fermentação como *S. cerevisiae* (Cregg, 1993; Cregg 2011). Estas duas características da levedura *P. pastoris* possibilitou sua utilização na expressão de duas enzimas usadas no método de dosagem de glicerol. Para tal, os genes GUT1 e GPD2 de *Saccharomyces cerevisiae* foram inseridos na levedura *P. pastoris* a fim de produzir, no meio de cultivo, a glicerol quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase, segundo Peres et al. (2010). Resultados de dosagens de glicerol em bebidas mostram a validação do método (Tabela 9.2) e possibilidade de aplicação no acompanhamento de fermentações.

---

1 Ver: <[http://www.pichia.com/pichia\\_system.pdf](http://www.pichia.com/pichia_system.pdf)>.

Tabela 9.2 – Comparação de dosagem de glicerol utilizando *kit* comercial e GK e GPD recombinantes de *P. pastoris*.

Amostra	Tempo de cultivo (h)	Concentração de glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	
		Kit comercial	GK e GPD recombinantes de <i>P. pastoris</i>
Caldo fermentado por <i>S. cerevisiae</i>	12	4,2 ± 0,3	4,7 ± 0,3
Caldo fermentado por <i>S. cerevisiae</i> contendo 5,7 mg L <sup>-1</sup> de glicerol adicionado de 2,8 mg L <sup>-1</sup> de glicerol	–	8,3 ± 0,0 (97,6%)	8,2 ± 0,1 (96,4%)

### Enzima álcool desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* expressa em *E. coli*

O gene codificador da enzima álcool desidrogenase (ADH1) de *S. cerevisiae* foi clonado no vetor pET28a para expressão em *E. coli* (BL21) e a ADH utilizada num *kit* de dosagem de etanol. A produção e solubilidade da enzima álcool desidrogenase foi determinada. A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade.

A atividade enzimática de álcool desidrogenase purificada foi determinada por meio de ensaios para leituras no UV, bem como sua estabilidade em diversas condições de tempo e temperatura. Os resultados demonstraram que a enzima obtida apresentou boa atividade biológica *in vitro*, com sensibilidade na detecção de, no mínimo, 2,3 x 10<sup>-4</sup> g/L de etanol em 2 minutos. Além disso, a proteína purificada teve sua atividade preservada quando estocada a -20°C durante quatro meses. A quantificação enzimática de etanol em diferentes bebidas, utilizando álcool desidrogenase de *S. cerevisiae*, purificada a partir da bactéria *E. coli* mostrou valores de desvio padrão inferiores a 10% (Tabela 9.3).

Tabela 9.3 – Valor esperado e valor encontrado de etanol em bebidas utilizando ADH de *S. cerevisiae* clonada em *E. coli*.

Amostra	Valor esperado (% Vol.)	Valor encontrado (% Vol.)
Cerveja 1	4,8	4,8 ± 0,2
Cerveja 2	4,6	4,6 ± 0,3
Uísque	40	39,5 ± 0,4
Aguardente	39	41 ± 0,3



## Considerações finais

Estudos das enzimas poderão servir de base para aplicações industriais na quantificação de produtos em processos de obtenção de energia renovável. O custo de produção das enzimas é, juntamente com a etapa de pré-tratamento da biomassa, um dos principais entraves na comercialização tecnológica da hidrólise enzimática. A aplicação de celulases na conversão de biomassa celulolítica em açúcares para a fermentação de etanol e outros produtos pode prover grandes benefícios ambientais e econômicos. A utilização de enzimas estáveis à temperatura ambiente tem potencial aplicação em *kits* de quantificação de concentrações de etanol e glicerol, produto e subproduto de fermentação alcoólica que são determinados pelos métodos rápidos, precisos e de baixo custo, ferramenta importante na indústria cosmética, alimentícia e de combustível. Clonagens de genes codificadores de enzimas da classe das oxidoredutases em diferentes microrganismos e visando à secreção destas no meio de cultivo constituem procedimentos promissores para novos métodos analíticos de dosagens de produtos e subprodutos do metabolismo celular na obtenção industrial do etanol de segunda geração.

## Referências bibliográficas

- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, v.40, p.399-407, 2008.
- AMORIN, H. V. *Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia*. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448p.
- ANDERSON, S. M.; NGEH-NGWAINBI, J. The use of statistics in developing intra-laboratory method validation guidelines. In: *Quality Assurance for Analytical Laboratories*. Gateshead Press, Athenaeum UK: 1995. p.24-7.
- AZZAM, A. M. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *Journal of Environmental Science and Health B*, v.24 (4), p.421-33, 1989.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, v.52 (2), p.858-75, 2011.
- BASTOS, V. *Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias*. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, 2007, n.25, p.5-38.
- BEGUIN, P., AUBERT, J.-P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, v.13, p.25-58,1994.

- BERGMEYER, H. U. (Ed.) Measurement after electrophoretic separation. In: *Methods of enzymatic analysis*, New York: Academic Press, 1983, v.2, p.438-42.
- BISARIA, V.S. Bioprocessing of agro-residues to glucose and chemicals. In: Martin, A.M. (Ed.), *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*: London, Elsevier. 1991, p.210-13.
- BJERRE, A.B., OLESEN, A.B., FERNQVIST, T. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnology Bioengineering*, v.49, p.568-77, 1996.
- BOERINGER MANHEIM. Biochemica. *Methods of enzymatic bioanalysis and food analysis*. Mannheim: Boehringer Mannheim GmbH Biochemical's, 1997, p.62-6.
- BONNICHSEN, R. Determination with alcohol dehydrogenase and DPN. In: BERGMEYER, H.U. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 1965. p.285-7.
- CADOCHE, L., LOPEZ, G. D. Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biological Wastes*, v.30, p.153-7, 1989.
- CAMARGO, L. A.; PERES, M. F. S.; GATTAS, E. A. L. Oxidases of bioanalysis and food controls. *Alimentos e Nutrição*, v.18, n.1, p.101-9, 2007.
- CARLSON, L. A.; WADSTROM, L.B. Determination of glycerides in blood serum. *Clinical Chimica Acta*, v.4, p.197-205, 1959.
- CHANDRA, M. et al. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. *Bioresource Technology*. v.100 (4), p.1659-62, 2009.
- COMPTON, J. C.; PURDY, W. C. Fluoral-P a member of a selective family of reagents for aldehydes. *Analytical Chimica Acta*, v.119, p.349-57, 1980.
- CREGG, J. *The Pichia system*. Disponível em: <[http://www.pichia.com/pichia\\_system.pdf](http://www.pichia.com/pichia_system.pdf)>. Acesso em: 27 jun. 2011.
- CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, v.11, p.905-10, 1993.
- DALE, B.E., HENK, L. L., SHIANG, M. Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammonia freeze-explosion. *Developments Industrial Microbiology*. v.26, p.223-33. 1984.
- DEMAIN, A. L. The business of biotechnology. *Industrial biotechnology*, Mary Ann Liebert Inc. Comp., v.3, n.3, p.269-83, 2007.
- DEVRIES, S. C. et al. Resource use efficiency and environmental performance of nine major biofuel crops, processed by first-generation conversion techniques. *Biomass and Bioenergy*. v.34 (5), p.588-601, 2010.
- DEVAUX-BASSÉGUY, R.; GROS, P.; BERGEL, A. Eletroenzymatic process: a clean technology alternative for highly selective synthesis? *Journal Chemical Technology Biotechnology*, v.68, p.389-96, 1997.
- DIXON, M.; WEBB, E. C. Enzyme classification. In: *Enzymes*. 3.ed. New York: Academic Press, 1979. Cap. 4, p.201-20.

- DRIFFIELD, M.; BRADLEY, E. L.; CASTLE, L. A method of test for residual isophorone diisocyanate trimer in new polyester-plyurethane coatings on light metal packaging using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, v.1141, n.1, p.61-6, 2007.
- DUFF, S.; MURRAY W. Bioconversion of forest products industry wastes cellulosics to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, v.55, p.1-33, 1996.
- EGGSTSTEIN, M.; KUHLMANN, E. Triglycerides and glycerol: determination after alkaline hydrolysis. In: BERGMAYER, H.U. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 1962. p.1925-35.
- EL-ZAWAWY, W. K. et al. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. *Carbohydrate Polymers*, v.84 (3), p.865-71, 2011.
- FAN, L. T.; LEE, Y. H.; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effect of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, v.22, p.177-99, 1980.
- FAN, L. T., GHARPURAY, M.M., LEE, Y.-H. In: *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*. Springer, Berlin, 1987. p.57.
- FANG, H.; ZHAO, C.; SONG, X.-Y. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. *Bioresource Technology*, v.101, p.4111-9, 2010.
- FOSSATI, P. et al. colorimetric assay of lipase in serum. *Clinical Chemistry*, v.38, p.211-5, 1992.
- GABHANE, J. et al. Influence of heating source on the efficacy of lignocellulosic treatment-A cellulosic ethanol perspective. *Biomass and Bioenergy*, v.35 (1), p.96-102, 2011.
- GÁLVEZ LO. Diversified production of the sugarcane agro-industry. In: Gálvez LO, (Ed). *Handbook of sugarcane derivatives*. 3<sup>rd</sup> ed. Havana: ICIDCA, 2000. p.3-17.
- GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*, v.23, n.7-8, p.471-99, 2005.
- GOLDEMBERG, J., COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energy Policy*, v.36 (6), 2008, p.2086-97.
- GREGG, D.; SADDLER, J. N. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotechnology and Bioengineering*, v.51, p.375-83, 1996.
- GRETHLEIN, H. The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Biotechnology*, v.3(2), p.155-60, 1985.
- HAMANO, T. et al. Determination of glycerol in foods by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, v.511, p.265-72, 1991.
- HIGGINS, I. J. What is Biotechnology. In: *Biotechnology: Principals and Applications*. HIGGINS, I. J., BEST, D. J., JONES, J. (Eds.) Blackwell Scientific Publications, London, 1985, 1-23.

- INCE, J. E.; MACADAM, A. M.; KNOWLES, C. L-glycerol phosphate oxidase from *Propionibacterium freudenreichii*. *FEMS Microbiology Letters*, v.44, p.185-91, 1987.
- IUBMB. *Enzyme nomenclature: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*. San Diego (EUA): Academic Press, 1992. 863p.
- JIANG, X et al. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.111(2), p.121-7, 2011.
- KAHLE, V.; TESARICH, K. Separations of saccharides and their anomers by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, v.191, p.121- 8, 1980.
- KOBASYASHI, K.; KAWAI, S. Enzymatic determinations of hydrogen peroxide using Gas Chromatography. *Journal of Chromatography*, v.245, p.339-49, 1982.
- LAURELL, S.; TIBBLING, G. An enzymatic fluorometric micromethod for the determination of glycerol. *Clinical Chimica Acta*, v.13, p.317-22, 1966.
- LENZ, J. et al. Changes of structure and morphology of regenerated cellulose caused by acid and enzymatic hydrolysis. *Journal of Applied Polymer Science*, v.41, p.1315-26, 1990.
- LÉRIC, H.; KAPLAN, J.; BROUN, G. A colorimetric micromethod for the enzymatic assay of ethanol in blood. *Clinical Chimica Acta*, v.29, p.523-8, 1970.
- LIM H. H.; BUTTERY, J. E. Determination of ethanol in serum by an enzymatic pms-int colorimetric method. *Clinical Chimica Acta*, v.75, p.9-12, 1977.
- LIN, L et al. Biodiesel production from crude rice bran oil properties as fuel. *Applied Energy*, v.86, p.681-8, 2009.
- MARTÍN, C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbial Technology*. v.31, p.274-82, 2002.
- MEKALA, N. K. et al. Cellulase Production Under Solid-State Fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical Optimization of Process Parameters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.151, p.122-31, 2008.
- MOONEY, C. et al. The effect of the initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresource Technology*, v.64, p.113-9, 1998.
- OJEDA, K.; KAFAROV, V. Exergy analysis of enzymatic hydrolysis reactors for transformation of lignocellulosic biomass to bioethanol. *Chemical Engineering Journal*, v.154, p.390-5, 2009.
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, n.1, p.34-50, 2000.
- PAL, A.; KHANUM F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: Individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. *Process Biochemistry*, v.46, p.879-87, 2011.
- PECINA, R. et al. High performance liquid chromatographic elution behavior alcohols, aldehydes, ketones, organics acids and carbohydrates on a strong cation-exchange stationary phase. *Journal of Chromatography*, v.287, p.245-58, 1984.

- PENTTILÄ, M et al. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, v.61 (2), p.155-64, 1987.
- PERES, M. F. S. et al. Recombinant expression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase using the *Pichia pastoris* system, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.65, p.128-32, 2010.
- PERSSON, I.; TJERNELD, F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fungal cellulolytic enzyme production: A review. *Process Biochemistry*, v.26 (2), p.65-74, 1991.
- PRABLU, S. V.; BALDWIN, R. P. High pH ion-exchange separation and electrochemical detection of alditols, carbohydrates and acidic sugars. *Journal of Chromatography*, v.503, p.227-35, 1990.
- RAMOS, L. P.; NAZHAD, M. M.; SADDLER, J. N. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphology and fine structure of pretreated cellulosic residues. *Enzyme Microbial Technology*, v.15, p.821-31, 1993.
- RESHAMWALA, S.; SHAWKY, B. T.; DALE, B. E. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass. *Applied Biochemistry Biotechnology*. v.51/52, p.43-55, 1995.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa. 2004. v.1. 416p.
- SANTOS, E. *Utilização de enzimas produzidas por Trichoderma reesei e Aspergillus niger na extração de óleos essenciais*. 2008. 125 p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista: Araraquara, Brasil, 2008.
- SOLOMON, B. D.; BARNES, J. R.; HALVORSEN, K. E. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass and Bioenergy*, v.31(6), 2007, p.416-25.
- STERNBERG, D. Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, v.6, p.35-53, 1976.
- SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v.83, p.1-11, 2002.
- THOMPSON, D. N.; CHEN, H-C. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. *Bioresource Technology*, v.39, p.155-63, 1992.
- TININIS, C. R. C. S. *Ensaio enzimático para dosagem do glicerol*. 2001. 124p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara, 2001.
- TOMME, P.; WARREN R. A. J.; GILKES, N. R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbial Physiology*, v.37, p.1-81, 1995.
- VÁSQUEZ, M. P et al. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v.137-140, (1-12), p.141-53, 2007.
- WANG, J. et al. Highly selective and sensitive amperometric biosensing of glucose at ruthenium-dispersed carbon paste enzyme electrodes. *Analytical Letter*, v.26, p.1819-30, 1993.
- WHITAKER, D. R. Cellulases. In: *The Enzymes*, v.5, 1971, p.273-90.

- WIELAND, O. Glycerol, UV-method. In: BERGMAYER, H. U. *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press, 1962. p.211-4.
- WIMMER, M. C.; ARTISS, J. D.; ZAK, B. Peroxidase-coupled method for kinetic colorimetric of total creatine kinase activity in serum. *Clinical Chemistry*, v.31, p.1616-20, 1985.
- WRIGHT, J. D. Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Progress*, v.84 (8), p.62-74, 1998.
- ZANON, J. P. *Dosagem de etanol utilizando álcool desidrogenase de levedura de panificação*. 2006, 66p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara, 2006.
- ZANON, J. P.; PERES, M. F. S.; GATTÁS, E. A. L. Colorimetric assay of ethanol using alcohol dehydrogenase from dry baker's yeast, *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p.466-70, 2007.



## 10

# Resíduos agrícolas e agroindustriais: potencialidades de uso na produção de etanol

*Eleni Gomes, João Cláudio Thoméo,  
Heloiza Ferreira Alves Prado, Daniela Alonso Bocchini Martins,  
Roberto da Silva, Maurício Boscolo*

### Introdução

A crescente demanda energética, principalmente a de combustíveis para motores, associada a problemas relacionados ao petróleo e ao meio ambiente tem direcionado o foco para a bioenergia e principalmente para os biocombustíveis. Diversos estudos têm mostrado que a mistura de 10% de etanol a gasolina poderia reduzir em 3-6% a emissão de CO<sub>2</sub>, além de ser fonte renovável alternativa ao petróleo em todo o mundo.

Por outro lado, o aumento previsto no consumo de etanol e a consequente necessidade de aumentar sua produção geram preocupações com uma possível competição dos canaviais por terras agriculturáveis prejudicando uma produção agrícola mais diversificada. Assim, passou-se a considerar o uso de resíduos lignocelulósicos, que são matérias-primas renováveis e residuais da cadeia produtiva, como fonte de açúcares fermentescíveis para produção do etanol.

A oferta de resíduos lignocelulósicos em todo o mundo corresponde a aproximadamente  $2,9 \times 10^3$  milhões de toneladas produzidas em culturas de cereais,  $3 \times 10^3$  na produção de sementes e  $5,4 \times 10^2$  de outros tipos de cultura. Cerca de 50% dessa biomassa seria disponível para produção de etanol.



A economia brasileira está baseada na produção agrícola e agroindustrial, tendo como principais produtos a soja e outros grãos, a cana-de-açúcar, o café, mandioca e frutas. Essas atividades geram milhares de toneladas de subprodutos como o bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja, casca de frutas, farelo de trigo, palha e sabugo de milho etc., os quais correspondem a uma quantidade estimada de 1.000 t/ano. As principais culturas produzidas no Brasil e o tipo de subproduto que estas podem gerar são relacionados na Tabela 10.1.

O bagaço de cana-de-açúcar, ou “bagaço” como normalmente é chamado, é um material fibroso resultante da prensagem da cana para extração do suco. O Brasil produziu na safra 2009/2010 cerca de 600 milhões de toneladas de cana-de-açúcar que, processadas, geraram em torno de 180 milhões de toneladas de bagaço. Parte desse material está sendo usada para gerar energia elétrica ou para aquecimento de caldeiras, porém o excedente encontra-se nos pátios das usinas.

A composição do bagaço varia de 9-10% de umidade, 2-2,7% de cinzas, 32-55% de celulose, 16-25% de hemicelulose, 23-32% de lignina dependendo da variedade da cana e das condições climáticas durante o cultivo. Embora cerca de 80% de materiais lignocelulósicos possam corresponder a açúcares, sua complexidade exige uma tecnologia ainda não disponível para sua conversão a etanol de alta eficiência e rendimento. Na Tabela 10.2, são apresentadas as composições de outros resíduos agrícolas.

Tabela 10.1 – Porcentagem de produção de subprodutos de algumas culturas cultivadas no Brasil e respectivos componentes.

<i>Cultura</i>	<i>Subproduto (%)</i>	<i>Componentes do subproduto</i>
Algodão	53,0	Caroço, farelo, línter, borra e estearina
Amendoim	74,5	Farelo, casca e borra
Soja	75,0	Farelo e borra
Arroz	55,7	Palha e farelo
Trigo	47,5	Palha e farelo
Cevada	49,2	Palha e farelo
Cana-de-açúcar	10,0*	Ponta de cana
Milho	50,0	Colmo, folha, sabugo e brácteas.

\*10% do total de cana-de-açúcar colhida para industrialização.

Fonte: Peixoto et al., 1995.

Tabela 10.2 – Composições químicas das paredes celulares de alguns resíduos agrícolas

C Cultura	Celulose (%MS)	Hemicelulose (%MS)	Lignina (%MS)
Palha milho	33.5	24.9	7.8
Colmo milho	33.6	23.7	8.7
Folha milho	24.5	27.3	5.4
Sabugo milho	37.7	39.6	7.3
Fibra de coco	36.0-43.0	0.15-0.25	41.0-45.0
Palha de trigo	33-38	26-32	17-19
Farelo de trigo	30.0	50.0	15.0
Palha de arroz	28.0-36.0	23.0-28.0	12.0-14.0
	32.0-47.0	19.0-27.0	5.0-24.0
	35.2	22.1	4.3
Colmo de sorgo	27.0	25.0	11.0
Palha de cevada	31.0-45.0	27.0-38.0	14.0-19.0
	31.6	25.4	11.0
Palha de aveia	30.0	22.0	8.5
Semente de uva	7.10	31.1	43.5
Grape stalk	29.9	35.3	22.9

Fonte: Graminha et al. (2008).

## Composição química e estrutural dos constituintes da parede celular vegetal

A parede celular das plantas é uma estrutura biológica complexa que contém polímeros e outras moléculas, cujas proporções e organização estrutural dependem do tipo e idade da planta. O crescimento da parede primária se dá quando a célula vegetal está em fase de alongamento e, durante esta fase, é composta por polissacarídeos como pectinas, xilanas e celulose, por proteínas e ácidos fenólicos, porém, não há deposição de lignina. Quando o alongamento cessa, a célula da planta passa para a fase de formação da parede secundária. Nessa fase, a parede celular começa a engrossar crescendo da porção interior da parede primária em direção ao centro da célula da planta (Jung et al., 1992).

Durante o engrossamento progressivo da parede secundária, há maior depósito de celulose do que xilana, e pectina e ácido ferúlico não são mais adicionados, iniciando-se a deposição de lignina (Jung; Allen, 1995). A inclusão da lignina na parede celular começa na lamela média (espaço entre as células do tecido da planta e a parede primária) e continua em direção à parede secundária. Esse padrão de deposição de lignina faz que os polissacarídeos mais recentemente depositados na parede secundária não estejam lignificados enquanto o centro da lamela, região original da parede primária, é mais intensamente lignificado (Dey; Brinson, 1984).

Dessa forma, para que a celulose e a hemicelulose, que constituem a base de fornecimento de carboidratos, possam ser totalmente utilizadas, suas ligações com a matriz de lignina precisam ser quebradas. Para um entendimento da recalitrância dessa estrutura e das limitações da ação das enzimas e de outros mecanismos usados na hidrólise, será feita uma descrição dos componentes e da forma de organização dos polímeros que compõem esses materiais.

## Celulose

A celulose é o principal componente de diversos tipos de material vegetal; é encontrada também em células procariotas (*Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Sarcina ventriculi*) e em eucariotos tunicados (Ascite), algas (*Valonia* e *Microdictyon*), fungos (Oomycetes).

As cadeias de celulose estão organizadas dentro de microfibrilas que são a base da estrutura da parede celular. Essas microfibrilas constituem cerca de 20%-30% e 15% do peso seco e volume da parede celular, respectivamente. Nas paredes secundárias, a celulose chega a 40%-90% da biomassa. As fibrilas de celulose da parede encontram-se em uma matriz entrelaçada de polissacarídeos hemicelulósicos os quais se ligam por pontes de hidrogênio a mais de uma fibrila, além disso, interações iônicas e pontes de sais entre os polissacarídeos e proteínas são observadas (Prado et al., 2010)

A estrutura básica de celulose é uma cadeia linear de resíduos de D-glicose ligados por ligação glicosídica  $\beta$ -(1,4) e com terminações quimicamente diferentes, sendo uma com grupo D-glicopiranosil com o carbono anomérico envolvido na ligação glicosídica e outra, com resíduo D-glicopiranoose, com o carbono anomérico livre. Esse hemiacetal cíclico promove

um equilíbrio anomérico  $\alpha$ ,  $\beta$  via uma pequena proporção de aldeído livre e dá as propriedades da terminação da cadeia (Figura 10.1). O grau de polimerização varia de centenas a milhares de unidades de glicose, dependendo da fonte de origem (Pérez; Somain, 2010).

As cadeias de glicose são alinhadas em estrutura mais ou menos organizadas denominadas regiões cristalinas e amorfas. As regiões cristalinas são formadas por pontes de hidrogênio entre os grupos de hidroxilas livres na molécula e obedecem a vários ordenamentos de arranjos e, em geral, correspondem a 70% da estrutura.

Na conformação cristalina, cada glicose está “torcida” em  $180^\circ$  em relação à anterior e a seus anéis subsequentes, de forma tal que os grupos exocíclicos alcoólicos primários apontam alternadamente para a direita e para esquerda da direção da cadeia. A cadeia é estabilizada por ligações de hidrogênio que ajudam a manter e reforçar a conformação linear e plana da cadeia. Em função dos átomos de hidrogênio alifáticos em posições axiais e todos os grupos polares de hidroxilas em posições equatoriais, as partes superior e inferior das cadeias de celulose são hidrofóbicas, enquanto as laterais das cadeias são hidrofílicas e capazes de fazer ligações de hidrogênio (Ogeda; Petri, 2010).

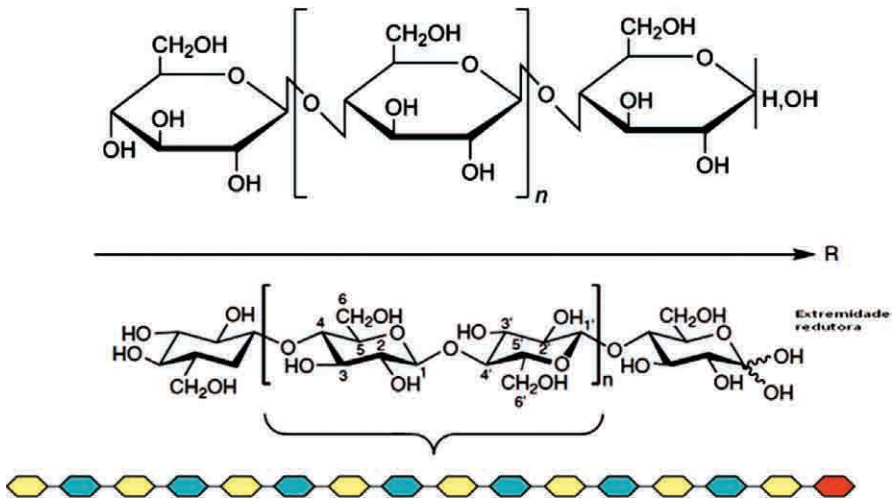


Figura 10.1 – Estrutura básica e de polarização química da cadeia de celulose

$n$  = número de unidades de dissacarídeos

Fontes: Atala; Isogai, 2010; Perez; Samin, 2010.

Em função da cristalinidade, as celuloses são divididas em família alomórficas I, II, III e IV as quais, por difração de raios x, podem ser diferenciadas em sete formas ( $I\alpha$ ,  $I\beta$ , II,  $III_I$ ,  $III_{II}$ ,  $IV_I$  e  $IV_{II}$ ) com características físicas e químicas próprias, como solubilidade, densidade, ponto de fusão, forma do cristal, além de propriedades ópticas e elétricas as quais são interconversíveis (Ogeda; Petri, 2010).

A celulose I ou celulose nativa é a mais abundante e complexa com regiões cristalinas  $I\alpha$  e  $I\beta$ . Celulose  $I\alpha$  é a alomorfa majoritária em bactérias e fungos com um resíduo de celobiose por cela unitária e pode ser convertida à forma mais estável  $I\beta$  por aquecimento a  $270^\circ\text{C}$ . Celulose  $I\beta$  é a forma cristalina mais comum em plantas superiores e tem duas metades de celobiose por cela unitária.

A celulose II é formada a partir de regeneração (mistura da celulose em solvente adequado seguida de coagulação e recristalização) ou mercerização (tratamento com NaOH concentrado) da celulose I e é o polimorfo mais adequado para produção de tecidos por ser termodinamicamente mais estável (Pérez; Samain, 2010).

A celulose III é obtida a partir da celulose I (celulose  $III_I$ ) ou II (celulose  $III_{II}$ ) tratadas com 1,2-diaminoetano. Essas celuloses tratadas com glicerol em alta temperatura formam as celuloses  $IV_I$  ou  $IV_{II}$ . As formas da celulose e suas interconversões são mostradas na Figura 10.2.

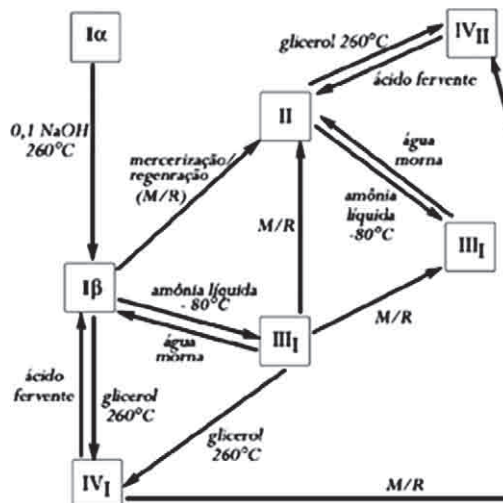


Figura 10.2 – Esquema da conversibilidade entre os tipos de celulose

Fonte: Ogeda, Petri 2010

As celuloses com grau de polimerização (DP) de 200-300 são solúveis em NaOH a 6-9%, enquanto aquelas com DP maiores que 500 são solubilizadas apenas em NaOH quando associado a explosão de vapor. Vários solventes também são capazes de solubilizar a celulose como dimetilsulfóxido (DMSO), N,N-dimetilacetamida (DMAc) ácido tricloroacético (TCA). Os grupos acetal das ligações  $\beta$ -(1,4) são instáveis em meio ácido, o que torna a celulose mais suscetível a hidrólise ácida, porém, essa suscetibilidade é maior nas regiões amorfas, permitindo uma hidrólise sequencial da celulose (amorfa/cristalina) (Abeer et al., 2010).

## Hemiceluloses

A hemicelulose representa de 15% a 35% da biomassa vegetal e, diferentemente da celulose, não é quimicamente homogênea, sendo formada por pentoses ( $\beta$ -D-xilose,  $\alpha$ -L-arabinose), hexoses ( $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-glicose,  $\alpha$ -D-galactose) e ácidos urônicos ( $\alpha$ -D-glicurônico,  $\alpha$ -D-4-O-metilgalacturônico e ácido  $\alpha$ -D-galacturônico). Pode ainda aparecer açúcares como  $\alpha$ -L-raminose e  $\alpha$ -L-fucose, além de açúcares com grupos hidroxilas substituídos com grupo acetil. As xilanas, que são polímeros lineares de xilose, podem corresponder de 20%-30% da hemicelulose de plantas herbáceas e 50% em capins e cereais (Glazer; Nikaido, 2007).

As hemiceluloses são formadas por diferentes proporções e combinações dos açúcares relacionados acima em função das quais são classificadas. A seguir são descritos os tipos de hemiceluloses de acordo com Girio et al. (2010).

As glicuronoxilanas (O-acetil-4-O-metil glicuronoxilana) consistem de polímero de  $\beta$ -D-xilopiranosil ligados por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4). Algumas unidades de xilose são acetiladas nos carbonos 2 e/ou 3, além de algumas fazerem ligação  $\alpha$ -(1,2) com ácido O-metil glicurônico. Essas hemiceluloses podem conter glicomananas, L-raminose e ácido galacturônico e aparecem em madeiras duras nas quais representam de 15%-30% da biomassa.

As galactoglicomananas (O-acetil galactoglicomanana) possuem cadeia linear central formada por resíduos de  $\beta$ -D-glicopiranosil e  $\beta$ -D-manopiranosil unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4). Esses resíduos podem ser acetilados nos C2 ou C3 e substituídos pelo  $\alpha$ -D-galactopiranosil

ligado a glicose ou manose por ligações tipo  $\alpha$ -1,6. Essas hemiceluloses são típicas de madeiras moles e podem corresponder a 20%-25% da biomassa.

As arabinoglucuronoxilanas (arabino-4-*O*-metil glicuronoxilanas) consistem de uma cadeia central linear de  $\beta$ -(1,4)-D-xilopiranosose contendo ligações glicosídicas laterais tipo  $\alpha$ -(1,3) e  $\alpha$ -(1,2) com 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glicopiranosil ácido urônico e  $\alpha$ -L-arabinofuranosil. São as principais hemiceluloses de tecidos não lenhosos, como os resíduos agrícolas, e aparecem em menor proporção em madeiras moles.

As xiloglicanas consistem de cadeia central de unidades de D-glicose ligadas por ligação  $\beta$ -1,4. A maior parte dos resíduos (75%) tem xilose substituintes em *O*-6. Resíduos de L-arabinose e D-galactose podem aparecer ligados aos resíduos de xilose formando sequências de di ou triglicosil, além de grupos acetilas. Essas hemiceluloses ligam-se às microfibrilas de celulose por pontes de hidrogênio e contribuem para a formação da estrutura do material. São mais frequentes na parede primária de madeiras moles dicotiledôneas e aparecem também em pequenas quantidades, nas gramíneas.

As arabinoxilanas são cadeias lineares de  $\beta$ -(1,4)-D-xilopiranosídeo com unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil como substituintes nas posições 2-*O* e/ou 3-*O* e de  $\alpha$ -D-glicopiranosil urônico ou seu derivado 4-*O*-metil na posição 2-*O*. Os resíduos arabinofuranosil podem estar esterificados com ácidos ferúlico e *p*-cumárico. Essas xilanas são comuns na parede celular de grãos de cereais.

As heteroxilanas complexas são cadeias de  $\beta$ -(1,4)-D-xilopiranosose com cadeias laterais mono e oligoglicosil, além de resíduos de ácido urônico e arabinosil. Aparecem em cereais, sementes, gomas e mucilagens (Figura 10.3).

O tipo de hemicelulose interfere nos processos de hidrólise do material lignocelulósico. Por exemplo, nas glicuronoxilanas, os grupos laterais 4-*O*-metil glicurônicos são mais resistentes ao tratamento ácido do que as porções acetiladas, enquanto as frações ligadas a L-raminose e ácido galacturônico são resistentes aos agentes alcalinos. As galactoglucumananas com maiores conteúdos de galactose são mais solúveis em água. A esterificação das arabinoxilanas com os ácidos fenólicos podem formar ligações cruzadas de xilanas (intra e intermolecular) o que reduz a extratibilidade da mesma (Pérez; Samain, 2010).





dois radicais terminais, resultando em um polímero ramificado através de formação tri, tetra, penta e oligolignóis (Jung; Himmelsbach, 1989).

Em gimnospermas, a lignina é formada principalmente pela polimerização de álcool coniferílico e nas angiospermas, pela polimerização de mistura de álcoois coniferílico e sinapílico. A lignina de gramíneas é formada por uma mistura dos álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico. Esses componentes são ligados ao acaso, sendo a ligação mais abundante na lignina a aril-glicerol- $\beta$ -eter ( $\beta$ -O-4) porém, outros tipos de ligação como fenilcumarana ( $\beta$ -5'), diaril propano ( $\beta$ -1'), pinoresinol ( $\beta$ - $\beta'$ ), difenil (5-5') e difenil éter (4-0-5') são encontrados (Da-Silva; Gomes, 2004).

A lignina é sempre associada com carboidratos, principalmente com as hemiceluloses, via ligação covalente nos carbonos  $\alpha$  e C-4 do anel benzênico, sendo essa associação chamada complexo lignina-carboidrato. Em plantas herbáceas, como no bagaço de cana, os ácidos *p*-cumárico e ferúlico fazem uma ponte entre a lignina e a hemicelulose por ligações éster ou éter, formando o complexo lignina/fenólicos-carboidrato (Figura 10.4b).

O aproveitamento de polissacarídeos de materiais lignocelulósicos depende da extração da lignina, cuja eficiência dos métodos está diretamente relacionada com a quebra das ligações éster e éter entre a lignina e os polissacarídeos. Tratamento ácido quebra as ligações  $\alpha$ -aril éter do complexo lignina/carboidrato mais rápido do que as  $\beta$ -aril éter, enquanto em meio alcalino essas últimas são mais rapidamente quebradas (Buranov; Mazza, 2010).

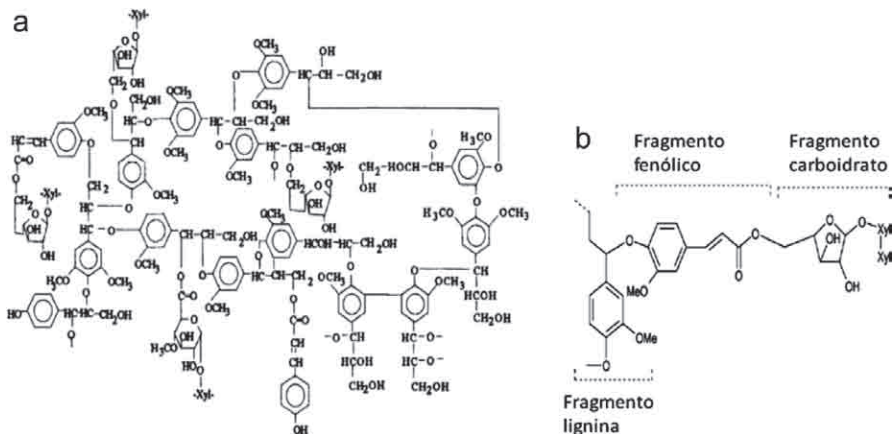


Figura 10.4—Estrutura deligninadegramíneas. a = estrutura proposta para ligninadegramíneas; b = complexo lignina/fenólicos-carboidratos

Fontes: Sun et al., 1997; Anvar; Mazza, 2008.

## Hidrólise do bagaço de cana para produção de etanol

A conversão de materiais lignocelulósicos a etanol implica duas etapas fundamentais: a sacarificação em açúcares fermentescíveis e a subsequente fermentação alcoólica. Atualmente, existem muitas patentes e trabalhos científicos publicados sobre a produção de açúcares para produção de etanol tendo como material de partida materiais residuais como o bagaço de cana-de-açúcar. No entanto, as poucas plantas industriais de etanol celulósico existentes sobrevivem com subsídios estatais, indicando que um longo caminho ainda deve ser percorrido para alcançar um processo econômico e tecnicamente viável.

A hidrólise dos materiais lignocelulósicos para produção de açúcares pode ser alcançada por métodos químicos e/ou enzimáticos. Existem processos patenteados para hidrólise química de bagaço de cana em meios ácidos e alcalinos com temperaturas acima de 180°C e altas pressões, produzindo hidrolisados ricos em açúcares fermentescíveis (glicose e xilose). Entretanto, são geradores de situação de riscos na planta industrial e propiciam a liberação de muitos compostos inibidores do processo de fermentação alcoólica subsequente, pois podem transformar a glicose liberada em hidroxifurfural, ácido levulínico, ácido fórmico (Figura 10.5) que são tóxicos para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

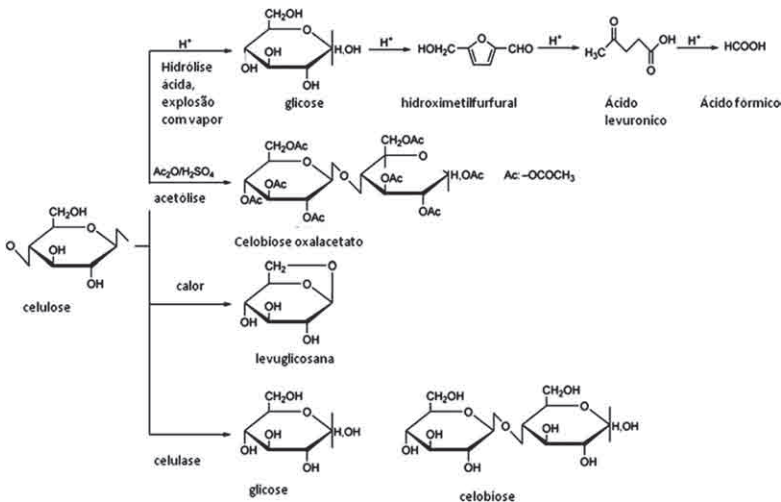


Figura 10.5 – Efeitos dos tratamentos térmico e ácido sobre a geração de produtos secundários/tóxicos no tratamento do bagaço

Fonte: Atalla; Isogai, 2010.

A hidrólise enzimática, que é desejável por ser específica, não gerando produtos tóxicos e por ser ambientalmente segura, porém, encontra um enorme obstáculo que é a estrutura altamente organizada desse material conferindo grande recalcitrância ao mesmo.

## Hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos

Na natureza, a degradação da biomassa por microrganismos é realizada por uma mistura complexa de enzimas, dentre as quais se destacam as celulases, hemicelulases e ligninases, cujas ações resultam em carboidratos que podem ser hidrolisados a sacarídeos solúveis e metabolizáveis, além dos produtos de despolimerização da lignina que podem ter ampla aplicação tecnológica (Sandgren et al., 2005). No processo de produção de etanol celulósico, a ação dessas enzimas é fundamental, em função da especificidade.

Uma descrição geral do modo de ação e produtos das principais enzimas degradadoras da biomassa será apresentada a seguir.

### Celulases

A produção de celulases microbianas ocorre, principalmente, por bactérias e fungos filamentosos, havendo poucos relatos de produção significativa por leveduras. Os ascomicetos e os fungos anamórficos têm grande importância como decompositores de celulose dos resíduos vegetais no solo, sendo conhecidos como fungo de podridão marrom (Sandgren; Hieberg, 2005).

Um sistema celulolítico baseado em enzimas “livres”, as quais agem sinergisticamente para a degradação completa da celulose (Figura 10.6), é normalmente produzido por fungos e bactérias aeróbicos. Este sistema enzimático inclui pelo menos três tipos de celulase (Alves-Prado et al., 2010).

Dois tipos de celulase são distinguidos em função da capacidade de reconhecer ou não a porção terminal da cadeia de glicose: as exocelulases ou celobiohidrolases (CBH) e as endocelulases ou endoglucanases (EG). As endoglucanases ou endo- $\beta$ -1,4-glicanase (EC 3.2.1.4) reconhecem e hidrolisam o polímero internamente nas regiões amorfas de forma aleatória, resultando na redução do grau de polimerização da molécula e, ao mesmo tempo, fornecendo substrato para as celobiohidrolases para agirem. As exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) reconhecem as extremidades da cadeia e atuam removendo unidades de celobiose. São distinguidos dois

tipos de CBH, as que atuam a partir da extremidade reductora (CBHI) e as que quebram a partir da extremidade não reductora (CBH II).

Alguns estudos, entretanto, questionam a existência dos tipos exo e endo e sugerem que todas as celulases são tipo endo. Desse modo, tem sido sugerida a classificação usada para as hidrolases de glicosídeos (Davies, Henrissat, 1995) que agruparia as celulases em processivas (ação continuada) e não processivas (ação não continuada) com base no modelo de hidrólise da cadeia. O tipo processivo pode hidrolisar sucessivamente a celulose até a formação da celobiose, por deslizamento ao longo da cadeia, sem separação do sítio de ligação da cadeia de celulose. Na celulase não processiva, o sítio ativo é desligado da celulose após cada hidrólise. Com base nessa classificação, a CHB poderia ser classificada como tipo endoprocessiva, enquanto a EG seria uma endo não processiva (Figura 10.6).

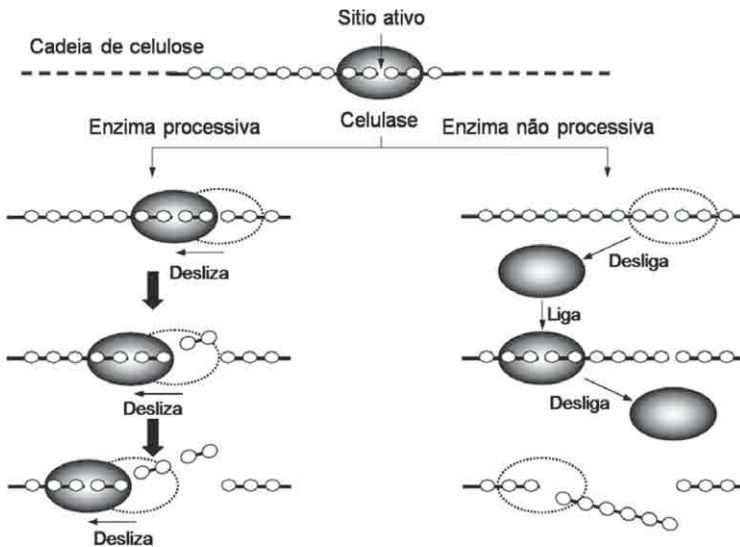


Figura 10.6 – Modelo de ação endoprocessiva e endo não processiva das celulases

Fonte Davies, Henrissat, 1995; Atalla; Isogai, 2010.

O terceiro componente do sistema é as  $\beta$ -glicosidasas (celobiasas) ou  $\beta$ -1,4-glicosidase (EC 3.2.1.21) que hidrolisam a celobiose e outros celoo-oligossacarídeos curtos liberando glicose. Algumas delas também estão envolvidas nas reações de transglicosilações de ligações  $\beta$ -glicosídicas de glicoses conjugados.

As enzimas do complexo celulolítico estão sujeitas à repressão catabólica pelo produto final de hidrólise. Por prevenir o acúmulo de celobiose, a  $\beta$ -glicosidase é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise celulolítica, desempenhando, assim, um efeito crucial na degradação enzimática do polímero (Leite et al., 2008).

Além das celulases clássicas, a Figura 10.7 mostra também a ação da suolenina (*wollenins* em inglês, sinônimo de inchamento, expansão, intumescimento), a qual desempenha papel importante na degradação da celulose cristalina. Ela é uma proteína com similaridade de aminoácidos da expansina (*expansin*), uma proteína de plantas que regula o alargamento da parede celular de células em crescimento. Expansinas foram primeiramente isoladas do *Trichoderma reesei* em 1992, e acredita-se que estejam envolvidas no rompimento de ligações de hidrogênio entre as microfibrilas de celuloses ou entre celuloses e outros polissacarídeos da parede celular sem hidrolisá-los, mas causando o deslizamento de fibras de celulose ou de expansão da parede celular (Whitney et al., 2000). Tem sido relatado que a ação da suolenina ajuda a degradação enzimática de celulose, uma vez que causa um dano parcial e afrouxa a estrutura da celulose, semelhante à causada pelo tratamento com ultrassom, em liberar açúcares redutores (Saloheimo et al., 2002).

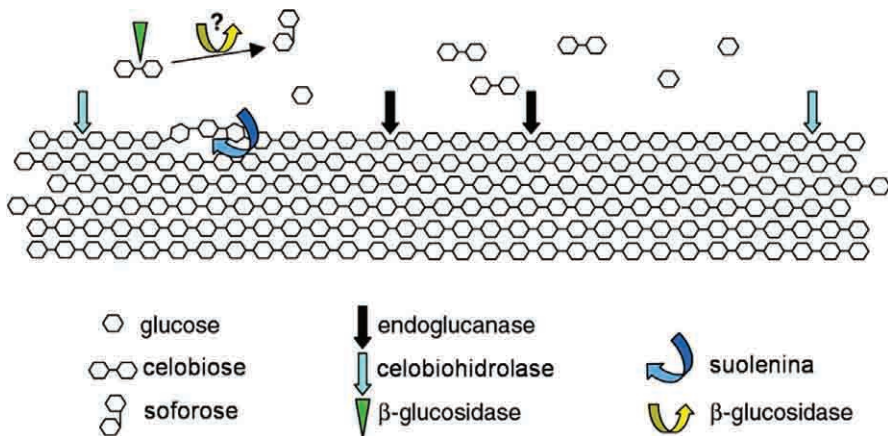


Figura 10.7 – Representação esquemática do sistema celulolítico. Os sítios de maiores atividades das enzimas celulolíticas são mostrados, além de um caminho alternativo de formação de soforose pela atividade de transglicosilação de  $\beta$ -glicosidase

Fonte: Aro et al., 2005.

A maioria das hidrolases de carboidratos são proteínas modulares que, além do sítio catalítico, contém também, um módulo de ligação ao carboidrato (CBM) (Jørgensen; 2007). Estes módulos foram inicialmente descobertos em celulases, mas é agora evidente que muitas outras hidrolases de carboidratos agem tanto em polissacarídeos solúveis quanto insolúveis, e a função deles é tanto trazer o sítio catalítico mais próximo ao substrato, quanto também garantir sua orientação correta. Além disso, já foi notado que alguns CBMs apresentaram um efeito rompedor de fibras de celulose (Boraston et al., 2004).

Nas celulases, o domínio de ligação à celulose é formado de aminoácidos hidrofóbicos como a fenilalanina, triptofano e tirosina, os quais se ligam à superfície hidrofóbica da celulose por força de Van der Waals. Essa interação facilita a associação da enzima com seu substrato, aumenta a concentração e a atividade da enzima no ponto de atuação e ainda auxilia diretamente na hidrólise da celulose por rompimento da estrutura cristalina. Os CBMs são classificados em 33 famílias em função de suas sequências peptídicas. Alguns CBMs, além de ligação a celulose, podem também apresentar afinidade por mananas, glicanas, xilanas. Além disso, um “*linker*” entre os dois domínios tem sido descrito (Flint et al., 2004).

O domínio catalítico contém o sítio ativo para hidrólise da celulose e o subsítio que interage com a cadeia de celulose próxima ao centro ativo. Esse subsítio estressa mecanicamente a cadeia de celulose e um dos resíduos de glicose é forçado a assumir a forma de barco instável, levando a redução da energia de ativação para a reação de hidrólise e o sítio ativo do domínio catalítico pode então atacar a cadeia de celulose.

Além das celulases hidrolíticas, enzima com atividade de oxidação de celodextrinas, denominada celobiose desidrogenase (CDH), atua de forma importante na degradação da celulose. Essa enzima, quando descoberta foi denominada celobiose quinona redutase (CBQ), posteriormente chamada de celobiose oxidase (CBO) e, finalmente, identificada como CDH (Wood; Wood, 1992). Essa enzima, com grupo prostético heme, atua como uma desidrogenase típica com ação de oxidação e redução. Na reação de oxidação, o hemiacetal do C1 livre da celobiose é convertido a lactona que sofre hidrólise espontânea a ácido carboxílico formando o ácido celobionico. Os dois elétrons liberados nessa reação são transferidos para receptor de dois elétrons ou para dois receptores de um elétron. Como receptor intermediário de elétrons tem sido indicado o FAD, que reduzido a  $FDH_2$  poderia

transferir esses elétrons a um aceptor final. Embora os substratos específicos das CDH sejam di ou trissacarídeos com ligações  $\beta$ -1,4 e com resíduos de glicose ou manose na extremidade redutora, essa enzima pode também oxidar celodextrinas, lactose, manobiose e galactosilmanose. Semelhante ao modelo das celulasas, essas enzimas também possuem sítio catalítico separado do sítio de ligação à celulose. Este último, com propriedade hidrofóbica, diferencia-se dos sítios de ligação de celulose das celulasas por serem altamente específicos para a região amorfa da celulose e não se ligam em xilanas, manana, amido ou quitina.

Outro sistema importante de degradação natural de celulose diz respeito ao sistema de celulosomas. Celulasas sintetizadas por bactérias anaeróbias, particularmente do gênero *Clostridium* e microrganismos do rúmen, frequentemente se agrupam em um grande complexo multienzimático (peso molecular  $>3$ MDa) denominado celulosomo e identificado pela primeira vez em 1983 a partir do *Clostridium thermocellum* esporulante (Lamed et al., 1983). Este celulosomo bacteriano apresenta atividade muito elevada sobre celulose cristalina (“a verdadeira atividade celulase” ou avicelase) que não é comumente observada entre celulasas fúngicas (Johnson et al., 1981).

Em *C. thermocellum*, as enzimas celulolíticas estão normalmente distribuídas tanto na fase líquida quanto na superfície das células. No entanto, várias espécies anaeróbias que degradam celulose não liberam quantidades mensuráveis de celulasas extracelulares, ficando os complexos localizados diretamente na superfície da célula ou no glicocálice da célula (Lynd et al., 2002). Além de *Clostridium* e outras bactérias anaeróbias, há evidências da presença de celulosoma em pelo menos uma bactéria aeróbia e alguns fungos anaeróbios, como *Neocallimastix*, *Piromyces* e *Orpinomyces* (Li et al., 1997).

Além de celulasas, o complexo de celulosomas também inclui enzimas como xilanasas, mananasas, arabinofuranosidasas, liquenases e pectina liases (Bayer et al., 2004). Todos os celulosomas descritos compartilham algumas características (Figura 10.8). Suas enzimas estão ligadas a módulos não catalíticos (domínio de peptídeo repetido-DPR) ou domínios chamados “doquerinas” (*dockerins*, com significado em inglês de ancorar, neste texto traduzido para doquerina), por meio dos módulos de ligação ao carboidrato (CBMs). Doquerinas se ligam, por meio de interações cálcio-dependentes, aos módulos “coesinas” (*coesin* com significado em inglês de proteína de integração, neste texto traduzido para coesina) localizadas em uma grande proteína não catalítica que atua como um “escafolde” (*scaffoldin*,

com significado em inglês de matriz de suporte, neste texto traduzido para escafolde). Em geral, o escafolde que é uma proteína grande e distinta, permite a ligação do complexo inteiro à parede celular da planta, por meio de uma CBM celulose-específica família3 (CBM3a), e à célula bacteriana por meio de um *dockerin* divergente C-terminal (Bayer et al., 1998; Nordon et al., 2009; Maki; Leung, 2009; Fontes Gilbert, 2010).

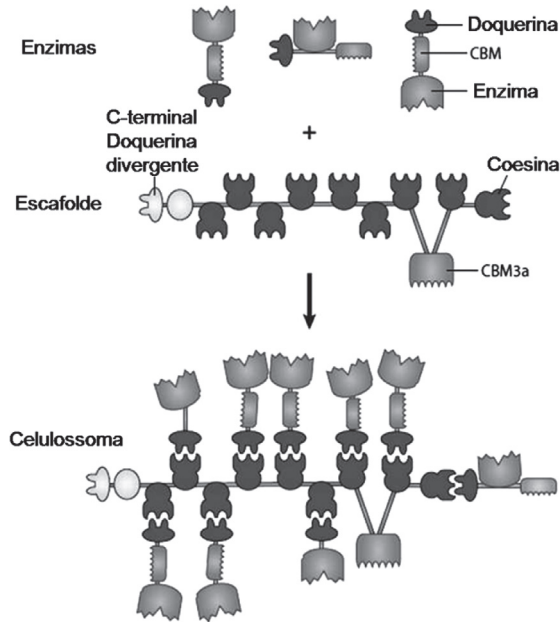


Figura 10.8 – Mecanismo de agrupamento do celulosoma

Fontes; Gilbert, 2010, Bocchini, 2011.

A recalcitrância e complexidade química de alguns polímeros representam um obstáculo para a degradação enzimática do material lignocelulósico, portanto, sistemas enzimáticos mais eficientes são necessários. Os celulosomas destacam-se como uma das nanomáquinas mais elaborada da natureza e o arranjo das enzimas degradadoras de parede celular de planta neste complexo tem vantagens sobre os sistemas de enzimas livres. Menos proteína total se torna necessário para a solubilização da celulose, incluindo a celulose cristalina, o que sugere que a atividade específica do celulosoma para tais substratos é maior do que a de sistemas de enzimas livres (Johnson et al., 1982; Boisset et al., 1999). Pode-se dizer que as enzimas do celulosoma estão “concentradas” e posicionadas em uma orientação adequada, tanto com



relação umas às outras quanto ao substrato celulósico, facilitando assim o sinergismo entre as unidades catalíticas e evitando a adsorção não produtiva. Estando o celossoma próximo à superfície celular dos microrganismos, os produtos de hidrólise inibidores não se acumulam, e são mantidos em concentrações adequadas para o uso mais eficiente da célula (Shohan et al., 1999).

## Hemicelulases

Em função da heterogeneidade da hemicelulose, sua hidrólise requer um amplo complexo enzimático formado por (Sunna, Antranikian, 1997): *Endo-1,4-β-D-xilanases* (EC 3.2.1.8) que hidrolisam ligações glicosídicas β-1,4 entre resíduos de xilose da cadeia central de xilana; *1,4-β-D-xilosidases* (EC 3.2.1.37) que liberam resíduos de β-D-xilose a partir da extremidade não redutora da xilobiose e de 4-β-D-xilooligosacarídeos curtos; *α-L-arabinofuranosidases* (EC 3.2.1.55) que removem cadeias laterais de L-arabinose ligadas à xilose da cadeia central de arabinoglicuronoxilana; *α-glicuronidases* (EC 3.2.1.1) que hidrolisam ligações glicosídicas α-1,2 entre resíduos de ácido glicurônico e de β-D-xilopiranosil das glicuronoxilanas (Figura 10.9).

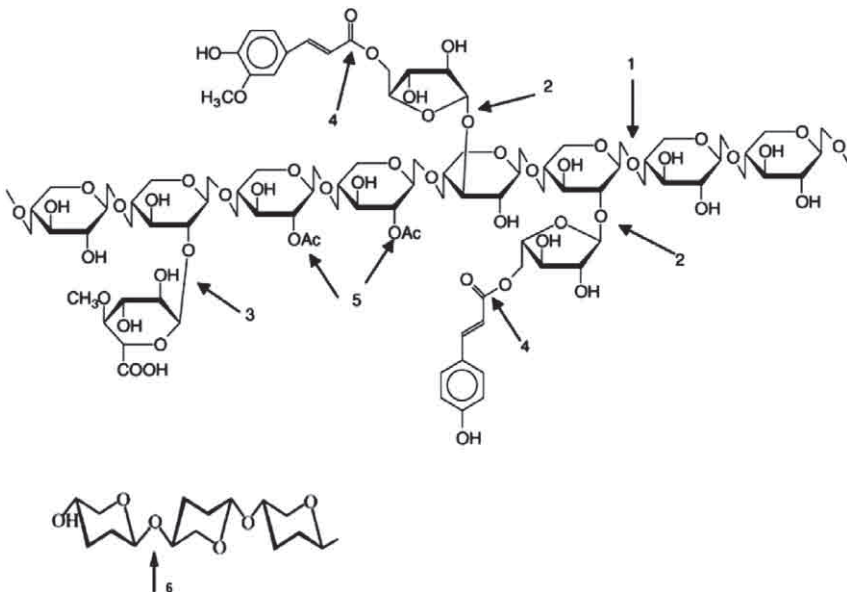


Figura 10.9 – Representação esquemática de uma molécula de xilana e as respectivas ações das enzimas do sistema xilanolítico. 1 – endoxilanases; 2 – *α-L-arabinofuranosidases*; 3 – glucuronidases; 4 – feruloil e cumaril esterases; 5 – acetil xilana esterases; 6 – *β-xilosidases*

Fonte: Chávez et al., 2006.

As endoxilanases, por atuarem internamente na xilana reduzindo o grau de polimerização, representam um papel crucial na decomposição das hemiceluloses. Xilanases com as proteínas em diferentes formas, mecanismos catalíticos, propriedades físico-químicas e especificidades para substratos (sua preferência para degradar substratos com diferentes DP, DS e padrão de substituição) são produzidos por uma grande variedade de organismos pro-e eucariotos (Iembo et al., 2002; Da-Silva et al., 2005; Bocchini et al., 2005).

A maioria das xilanases é classificada em família glicosilhidrolase (GH) 10 e GH11, enquanto uma minoria é pertencente às famílias GH5 e GH8 (Pollet et al., 2010). As xilanases pertencentes à família glicosilhidrolase 10 (GH10) apresentam maior versatilidade catalítica ou menor especificidade ao substrato do que aquelas pertencentes à família 11 (Biely et al., 1997). As xilanases da família 11 (GH11) clivam preferencialmente nas regiões não substituídas do esqueleto AX, enquanto a GH10 tem preferência pela região mais substituída, sendo, portanto, menos prejudicada pela presença de substituintes 4-*O*-metil-D-glucuronato, acetato e  $\alpha$ -L-arabinofuranosil ao longo da cadeia principal de xilana (Biely et al. 1997).

Geralmente, um alto grau de ramificação na cadeia principal é considerado um empecilho na degradação da xilana (Pollet et al. 2010), por obstruir a formação do complexo enzima-substrato. A degradação hemicelulose envolve também esterases como as *acetil xilano esterases (AcXEs)* e *ferruloil esterases ou esterases de ácidos p-cumárico e ferúlico* (EC 3.1.1.1). As primeiras, acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72), removem grupos *O*-acetil das posições 2 e/ou 3 de resíduos  $\beta$ -D-xilopiranosil de xilanas acetiladas, enquanto as segundas representam uma subclasse das hidrolases de éster carboxílicos, as quais liberam ácidos fenólicos (ácidos ferúlico e *p*-cumárico) de ligações ésteres entre esses grupos fenólicos e grupos carboxílicos de açúcares de hemicelulose e pectina (complexo lignina/fenólico-carboidrato, mencionado anteriormente).

A determinação das atividades dessas enzimas pode ser feita usando substratos sintéticos de ésteres metílicos e etílicos de ácido hidroxicinâmico (ácido *trans*-ferúlico) ou ácido ferúlico esterificado com oligossacarídeos como metil 5-*O*-transferruloil- $\alpha$ -L-arabino-furanosídeo.

O crescente interesse pelas EAF deve-se principalmente por estas enzimas facilitarem a desestruturação do material lignocelulósico, promovendo

a separação dos polímeros de açúcar da lignina. Essas enzimas de procariotos e eucariotos pertenciam originalmente à família 1 das carboidrato-esterases e sugere uma relação evolutiva entre a EAF, as xilano acetil-esterases e certas lipases. Recentemente, as EAF foram organizadas em 4 classes (A-D), levando-se em conta a especificidade por substratos sintéticos de ésteres metílicos de ácido hidroxicinâmico, especificidade para mono e diferulatos, atividade sobre substratos com substituições no anel aromático do fenol e a sequência primária da proteína. As EAF do tipo A mostram preferência por substratos contendo uma ou duas hidroxilas substituídas de ácidos *p*-cumárico ou cafeico; as do tipo B atuam mais eficientemente sobre substratos hidrofóbicos como derivados de benzeno; os tipos C e D exibem alta atividade sobre ácidos hidroxicinâmico como ácidos ferúlico, *p*-cumárico, cafeico e sinapínico (Topakas et al., 2007).

Outro interesse na ação das FAE tem a ver com a química fina. A hidrólise específica da ligação éster entre a porção do ácido fenólico e o açúcar resulta na produção de um ácido fenólico livre, que pode ser usado na produção de outros compostos de importância comercial, como o ácido *p*-cumárico, que é utilizado como ingrediente fotoativo em filtros solares, ou a biotransformação adicional que dará origem a vanilina natural.

## Ligninases

A decomposição de lignina é indispensável para a reciclagem do carbono, uma vez que esse polímero é a mais abundante fonte renovável de compostos aromáticos na natureza. Por causa de sua estrutura complexa e heterogênea, a lignina é quimicamente recalcitrante à degradação pela maioria dos organismos. Os basidiomicetos, chamados fungos da podridão branca, são os fungos que degradam a lignina de forma mais eficiente (Abrahão et al., 2008). Entre as enzimas envolvidas na biodegradação da lignina, as principais são as lacases, as lignina peroxidases e manganês peroxidases (Gomes et al., 2009; Wong, 2009).

## Lacases

As lacases (benzenediol: oxigênio oxirredutase, EC 1.10.3.2) fazem parte de um grupo de enzimas com funções de degradação e polimerização. Em plantas, essas enzimas exercem funções como cicatrização do tecido vegetal, biossíntese e degradação da lignina e, em fungos, participam, além

da biodecomposição da lignina, de processos fisiológicos vegetativos e reprodutivos, como pigmentação do conidióforo e síntese de melanina para composição da parede das hifas.

A lacase é classificada como fenol oxidase e catalisa a oxidação de vários compostos aromáticos e inorgânicos (particularmente fenóis) com concomitante redução de oxigênio a água. Entre os substratos oxidados por essa enzima encontram-se: corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, alguns difenilmetanos e benzopirenos (Duran; Esposito, 2000). A lacase pode degradar lignina mesmo na ausência de outras ligninases, como a manganês peroxidase e a lignina peroxidase (Mayer; Staples, 2002).

Essas enzimas pertencem ao grupo das enzimas cobre oxidases (ou oxidases de cobre) e de acordo com a ligação dos íons de cobre em seus sítios ativos, as enzimas de cobre são divididas em oxidases que possuem sítio mononuclear de cobre (um cento de cobre), como as amino oxidases, e as oxidases com sítio multinuclear de cobre (mais de um cento de cobre), como a tirosinase, ascorbato oxidase, ceruloplasmina e lacases.

As lacases, portanto, são proteínas multicobre pertencentes à família das enzimas oxidases azuis e geralmente contêm quatro íons cobre, agrupados em três grupos: T1, formado por um íon e é encarregado da oxidação do substrato e pela transferência de elétrons; T2, também formado por um íon e, juntamente com o grupo T3, que contém dois íons, constitui o centro trinuclear de cobre, envolvido na redução do oxigênio e liberação de água (Torres et al., 2003). O cobre localizado no sítio T1 é o responsável pela forte absorção da enzima na faixa dos 600nm; no entanto já foram descritas lacases deficientes de cobre em T1, chamadas de lacases brancas, por causa da ausência da absorbância característica na faixa do azul (Baldrian, 2010).

O mecanismo de catálise está fundamentado na redução do oxigênio molecular formando água, à custa de sucessivas oxidações monoelétrônicas do substrato. O ciclo catalítico das lacases inicia-se com a ligação de um substrato redutor em T1, no sítio ativo da enzima. O cobre ligado a T1 extrai elétrons do substrato e os transfere para o domínio trinuclear T2/T3, que reduz o  $O_2$  a  $H_2O$ , ao mesmo tempo que libera o substrato oxidado (Figura 10.10). Os radicais formados deflagram reações não enzimáticas que envolvem quebras alquil-arílicas, polimerização de compostos fenólicos e anilinas, oxidações nos  $C\alpha$  e desmetilações (Duran et al. 2002; Baldrian, 2010)

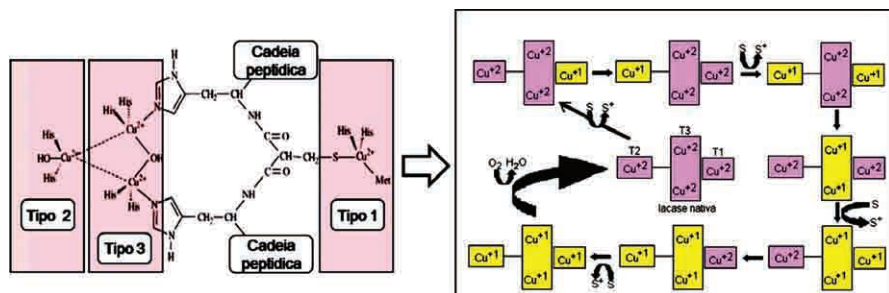


Figura 10.10 – Mecanismo de ação da lacase. À esquerda, o sítio catalítico das lacases, onde se pode observar a lacase nativa, constituída de seus 4 átomos de cobre com estado de oxidação  $2+$ . À direita, o ciclo catalítico das lacases, o qual envolve sucessivas transferências de elétrons entre os átomos de cobre. À medida que a enzima vai promovendo a oxidação de seus substratos, iniciado pelo sítio T1 que se reduz, os átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  vão se reduzindo e transferindo seus elétrons, de forma que o sítio 1 sempre esteja pronto para promover a oxidação de um substrato, até a completa redução de todos os sítios e sua reoxidação formando água para retomar novamente o ciclo.

Fonte: Duran et al. 2002; Villela, 2006.

As lacases podem interagir diretamente com substratos fenólicos e oxidáveis. Porém, em função do baixo potencial de oxidorredução, estas enzimas são incapazes de atuar diretamente sobre moléculas aromáticas não fenólicas, havendo então a necessidade de uma molécula mediadora para a degradação de tais compostos. Nesse mecanismo lacase-mediador, os mediadores oxidam substratos de alta massa molecular (Torres et al., 2003; Moreira Neto et al., 2009). Os mediadores são, de modo geral, substâncias de baixo peso molecular, secretadas pelo próprio fungo que, quando oxidados pelas lacases, são capazes de oxidar compostos que não seriam alvos diretos da enzima. O fenômeno da mediação amplia significativamente a gama de substratos destas enzimas (Leonowicz et al., 1999; Da Silva, Gomes, 2004). Entre os mediadores descritos estão os metabolitos de fungos como álcool veratrílico, ácido fenilacético, benzaldeído, anisalaldeído, hidroxibenzaldeído 4-hidrobenzil álcool, aminoácidos e derivados (metionina, cisteína, tirosina e glutatona) e sintéticos como o 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 1-hidroxibenzotriazol (HBT) epolioxometalatos – PMO).

## Peroxidasas

As peroxidases são um grupo de enzimas oxirredutases que oxidam substratos orgânicos, tendo o peróxido de hidrogênio como molécula aceptora de elétrons. Essas enzimas apresentam sítios ativos contendo gru-

pos prostéticos como ferriprotoporfirina IX. Na degradação da lignina, duas peroxidases são muito importantes: A lignina peroxidase (LiP; EC 1.11.1.14) e manganês peroxidase (MnP; EC 1.11.1.13), ambas são glicoproteínas globulares formadas por 11%-12% de  $\alpha$ -hélice com dois domínios delimitando uma cavidade central que abriga o grupo heme. Seus mecanismos de ação são apresentados a seguir.

### Lignina peroxidases (LiP)

A lignina peroxidase (LiP) (E. C. 1.11.1.14) é uma glicoproteína com grupo prostético constituído de ferro protoporfirina IX cuja atividade catalítica depende de  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  necessário à atividade da LiP origina-se de diferentes vias bioquímicas, expressas diferencialmente de acordo com fatores nutricionais e condições de crescimento do microrganismo (Evans et al., 1994; Pointing, 2001). LiP é uma enzima capaz de oxidar vários compostos aromáticos não fenólicos como o álcool benzílico, clivar cadeias laterais desses compostos, catalisar reações de abertura de anéis aromáticos, desmetoxilação e desclorinação oxidativa (Conessa et al., 2002).

A Figura 10.11 mostra o ciclo catalítico das LiP. O primeiro passo da catálise é a formação do composto I pela reação do peróxido de hidrogênio com o íon férrico da forma de repouso da enzima. Nesse mecanismo, o peróxido liga-se ao ferro do grupo heme com concomitante doação de um próton para o resíduo de histidina distal do átomo de oxigênio ligado ao ferro heme ( $\alpha$ -oxigênio), enquanto o resíduo de arginina distal é o estabilizador de cargas. A transferência do próton da histidina para o átomo de  $\beta$ -oxigênio resulta na clivagem heterolítica da ligação O-O do  $H_2O_2$  e na formação de  $H_2O$  e composto I. O composto I com dois elétrons oxidados sofre duas reduções sucessivas, via formação de composto II, com um elétron oxidado até retornar ao estado nativo de Ferro III.

O álcool veratrílico pode induzir a ação da enzima, protegê-la contra ativação por altos níveis de  $H_2O_2$ , além de atuar como cossustrato, conduzindo as oxidações de compostos aromáticos não fenólicos (Mesteret al., 1995; Pointing, 2001).

O peróxido de hidrogênio é o aceptor natural de dois elétrons, entretanto, nas peroxidases ligninolíticas diferem em seus substratos redutores que são oxidados por um elétron pelo composto I e II, respectivamente.

A LiP difere das demais peroxidases pelo fato de terem substratos aromáticos não fenólicos como preferenciais. Enquanto radicais fenoxilas são

os primeiros produtos de oxidação de substratos fenólicos pelas peroxidases em geral, os cátions aromáticos são formados após a oxidação de anéis aromáticos não fenólicos pela LiP.

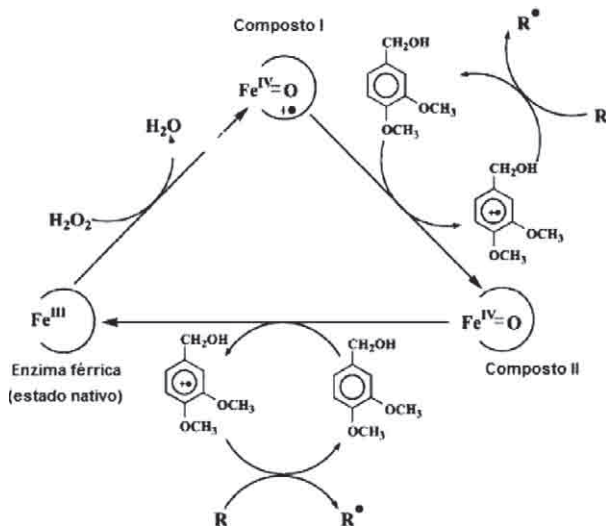


Figura 10.11 – Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP). Inicialmente, a enzima e o  $\text{Fe}^{3+}$  contido no sítio ativo são oxidados pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando água e um intermediário com dois elétrons oxidados, denominado Composto I. Este composto oxida o álcool veratrílico ou outro substrato, gerando um substrato-radical livre e o Composto II, no qual o ferro ainda está presente como  $\text{Fe}^{4+}$ . O Composto II oxida um segundo substrato (que pode ser outra molécula de álcool veratrílico), originando outro substrato-radical livre, e a enzima volta a sua conformação original.

Fonte: Hammel; Cullen, 2008.

### Manganês peroxidase (MnP)

A manganês peroxidase (MnP, E. C. 1.11.1.13) é uma enzima extracelular glicosilada com grupo prostético heme, encontrada apenas em basidiomicetos.

De modo geral, a MnP não desencadeia transformações diretas em seus substratos por ser uma oxidorreductase não específica. Com mecanismo catalítico da MnP é muito semelhante àquele descrito para a LiP e inclui uma enzima com íon férrico, bem como, compostos intermediários I e II. Porém, em contraste com a LiP, a MnP usa apenas o  $\text{Mn}^{2+}$  como substrato doador de elétrons, oxidando-o a  $\text{Mn}^{3+}$  que é o responsável pelo desencadeamento de reações de oxidação de outras moléculas orgânicas.

O ciclo catalítico inicia-se com a ligação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou um outro peróxido orgânico ao íon férrico da enzima, formando um complexo ferro-peróxido. A subsequente clivagem da ligação O-O do peróxido requer a transferência de dois elétrons do grupo heme, resultando na formação do Composto I da MnP, o qual é um complexo  $\text{Fe}^{4+}$ -oxo-porfirina. Em seguida, a ligação dióxigênio é quebrada heteroliticamente e uma molécula de água é liberada. A redução subsequente prossegue através do Composto II de MnP (complexo  $\text{Fe}^{4+}$ -oxo-porfirina). Um íon  $\text{Mn}^{2+}$  atua como doador de 1 elétron para essa porfirina, sendo oxidado a  $\text{Mn}^{3+}$ . A redução do Composto II gera um outro  $\text{Mn}^{3+}$  a partir de um segundo  $\text{Mn}^{2+}$  levando à regeneração da enzima nativa e liberando uma segunda molécula de água (Figura 10.11).

Enquanto o composto I da MnP, semelhante ao da LiP, pode ser reduzido por  $\text{Mn}^{2+}$  e também por outros diferentes doadores de elétrons, tais como compostos ferrocianidas e fenólicos, o Composto II MnP é produzido muito lentamente por outras substâncias e requer  $\text{Mn}^{2+}$  para completar o ciclo catalítico. As transferências de elétrons envolvendo o manganês ocorrem na presença de radicais dicarboxílicos, como oxalato, malato, fumarato e malonato (Leonowicz et al., 1999). Esses radicais são agentes quelantes de  $\text{Mn}^{3+}$ . Ao se complexarem, aparentemente, atuam como medidores de baixo peso molecular que efetivamente oxidarão os compostos fenólicos da lignina (Higuchi, 2004; Conessa et al., 2002).

O mecanismo de reação da MnP é similar ao de outras peroxidases, como a lignina peroxidase, mas nesse caso, os compostos I e II da MnP oxidam  $\text{Mn}^{2+}$  (Conessa et al., 2002).

Quelatos de  $\text{Mn}^{3+}$  com ácidos carboxílicos podem ainda reagir um com o outro e se converterem em radicais alquila, com subsequente reação espontânea com dióxigênio, resultando na formação de radicais superóxidos, que podem ser utilizados pela MnP em ausência de  $\text{H}_2\text{O}_2$  externo. Compostos aromáticos não fenólicos, com baixo potencial redox, como tetraxetoxibenzeno ou antraceno são sujeitos à oxidação pelo  $\text{Mn}^{3+}$  via retirada de um elétron do anel aromático, originando radicais cátions arila.

Algumas MnP, além do  $\text{Mn}^{2+}$ , oxidam também compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos (vermelho fenol, álcool veratrílico) sendo consideradas formas híbridas de LiP e MnP. Ainda não é clara a forma como atuam, a despeito do fato de LiP e MnP serem enzimas intimamente relacionadas.



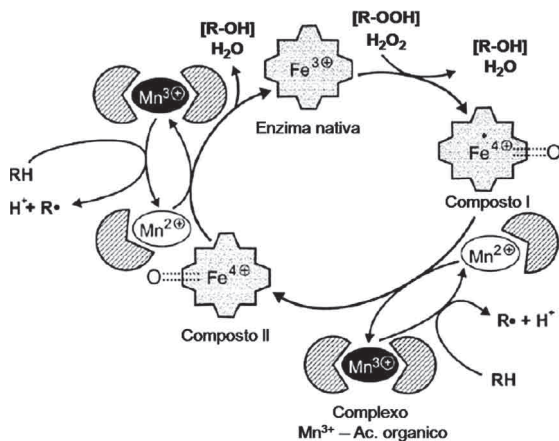


Figura 10.12 – Ciclo catalítico de manganês peroxidases. O ciclo catalítico da MnP inicia-se pela transferência de dois elétrons do sítio ativo da enzima para o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando o Composto I oxidado denominado Complexo  $\text{Fe}^{4+}$ -oxoporfirina, com liberação de água. A seguir, o  $\text{Mn}^{2+}$  reduz o Composto I a composto II, e é liberado na forma de  $\text{Mn}^{3+}$ . Uma segunda redução do composto II por outro átomo de  $\text{Mn}^{2+}$  restitui a enzima a sua configuração nativa.

Fonte: Hofrichter, 2002

## Hidrólise do material lignocelulósico por métodos físicos e químicos

Apesar da disponibilidade de complexos enzimáticos potencialmente capazes de hidrolisar materiais lignocelulósicos, a recalcitrância dos mesmos, em função da baixa porosidade desse material, da cristalinidade da celulose e da presença de hemicelulose e ligninas, dificulta o acesso das enzimas a seus substratos. Desse modo, tratamentos físicos e/ou químicos anteriores à hidrólise enzimática como diferentes formas de energias de alta frequência como micro-ondas, ultrassom, radiação ionizante e explosão de vapor, assim como diferentes combinações com ácidos ou álcalis são propostos.

### Explosão a vapor

A explosão a vapor foi desenvolvida em 1925 por W. H. Mason para a produção de madeira compensada. Desde então, o uso do processo tem sido expandido para outras aplicações como a produção de alimentos para ruminantes e polpação de madeira. O uso de explosão a vapor, para tratamento da biomassa vegetal, foi introduzido no início de 1980 (Fody, 1980). Neste trabalho foram descritos vários tempos de residência e pressões no

rendimento de xilose e glicose. Desde então, vários estudos aplicando explosão com vapor para pré-tratamento de vários materiais lignocelulósicos foram relatados. Schultz et al. (1984) avaliou a eficiência da explosão com vapor para pré-tratamento de misturas de cavacos de Madeira, casca de arroz, talos de milho e bagaço de cana-de-açúcar. Esses materiais, submetidos à explosão com vapor a 240°C-250°C por 1 minuto, apresentaram taxa de hidrólise enzimática semelhante àquelas obtidas com papel de filtro. O mecanismo de explosão com vapor foi descrito por Chornet e Overend (1988) como um processo termomecanoquímico que leva a um desarranjo dos componentes estruturais dos materiais lignocelulósicos pelo calor na forma de vapor (termo), por forças de atrito, por causa da expansão de umidade (mecânico) e por hidrólise de ligações glicosídicas (químicos).

No reator, vapor sob alta pressão penetra a estrutura lignocelulósica por difusão e condensa-se, sob a alta pressão, “molhando” o material. A umidade na biomassa hidrolisa os grupos acetis da fração hemicelulósica, formando ácidos orgânicos como acéticos e urônicos. Os ácidos, por sua vez catalisam a despolimerização da hemicelulose, liberando xilana e pequena quantidade de glicanas. Sob condições extremas, as regiões amorfas da celulose podem ser hidrolisadas em algum grau. Condições excessivas, isto é, temperaturas e pressões altas, porém, podem também promover a degradação da xilose para furfural e glicose para 5-hidroximetil furfural, os quais inibem crescimento microbiano, sendo então indesejável em uma fermentação. A biomassa “molhada” é “explodida” quando a pressão dentro do reator é liberada subitamente. O material é expulso do reator pela ação da força induzida. Vários fenômenos acontecem neste momento. Primeiro, a umidade condensada dentro da estrutura evapora instantaneamente em função da diminuição súbita da pressão. A expansão do vapor da água exerce uma força de atrito na estrutura circundante. Se esta força é alta o suficiente, o vapor causará o desarranjo mecânico da estrutura lignocelulósica. A descrição do processo destaca a importância de aperfeiçoar os dois fatores governantes: tempo de retenção e temperatura. A quantidade de tempo que a biomassa passa no reator ajuda a determinar a extensão de hidrólise da hemicelulose pelos ácidos orgânicos.

Tanahashi (1990) estudou os efeitos de explosão com vapor na morfologia e propriedades físicas da madeira. Foi mostrado que, em pressões maiores que 28 kg/cm<sup>2</sup> (230°C) e 16 minutos como tempo de residência, as microfibrilas da madeira tornaram-se completamente separadas umas das outras, além disso, ficaram mais finas e curtas com o aumento do tempo de exposição ao

vapor. A cristalinidade aumentou 1,5 vezes, e a largura da micela aumentou 2 vezes. Isso levou os pesquisadores a concluir que a celulose amorfa se torna cristalina durante o processo de explosão com vapor. Deste modo, o índice de cristalinidade e a largura da micela aumentam na madeira explodida com vapor. Uma análise térmica (baseada em temperatura de transição vítrea,  $T_g$ ) também foi realizada na madeira explodida, a qual demonstrou que a explosão com vapor, com moderada severidade, promove a deslignificação. Entretanto, os mesmos autores encontraram que, com tempos de tratamentos prolongados, pode ocorrer a repolimerização da lignina. Os efeitos de explosão com vapor em material lignocelulósico de madeira, divulgados na literatura, podem ser resumidos: 1) aumento da cristalinidade da celulose promovido pela cristalização da fração amorfa; 2) aumento da hidrólise da fração hemicelulose; 3) aumento de deslignificação; 4) tanto a deslignificação quanto a hidrólise da hemicelulose aumentam o volume dos poros das células na planta, e são então benéficas para a subsequente hidrólise da celulose; 5) o aumento de cristalinidade de celulose, porém, é uma desvantagem, pois reduz a hidrólise da celulose.

### **Micro-ondas**

A ação das micro-ondas sobre moléculas de água provoca um intenso movimento rotacional que, por atrito, gera aquecimento. Os choques provocados por este movimento rotacional podem ser úteis para promover a desestruturação do complexo ligno-hemicelulósico. Pré-tratamentos de biomassa com a aplicação de micro-ondas em meio alcalino reduziram em 50% o tempo para obtenção da mesma quantidade de açúcares redutores por hidrólise enzimática da palha de arroz quando comparado ao processo sem micro-ondas, e foi verificado um aumento de 5% no etanol obtido a partir de palha de trigo (Zhu et al., 2006). Dessa forma, a tecnologia na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar parece ser promissora principalmente pelo fato de poder ser aplicada sobre o bagaço em leito móvel, o que possibilita automação.

O uso de micro-ondas com pré-tratamento de bagaço de cana, associado com glicerol e  $H_2SO_4$  demonstrou ser eficiente para liberação de componentes fenólicos a partir da lignina, assim como promoveu maior hidrólise enzimática (Magalhães, 2011; Moretti et al., 2011, submetido) (Tabela 10.3).

### **Ultrassom**

A utilização de ultrassom em processos químicos vem se tornando mais frequente nos últimos anos. As ondas de choque ultrassônicas geradas em

meio líquido concentram alta energia e dão origem ao fenômeno da cavitação acústica, podendo romper paredes celulares o que favorece a ação enzimática. A irradiação ultrassônica tem sido usada para acelerar processos químicos e biológicos como a solubilização da lignina e da hemicelulose de bagaço de cana (Sun et al., 2004). A irradiação de ultrassom durante o processo enzimático de sacarificação de resíduos de papéis tem um efeito significativo na cinética do processo e no teor de açúcares solúveis totais. A utilização de ultrassom em ciclos intermitentes pode aumentar a produção e a liberação de glicose a partir da celulose (Wood et al., 1997).

Tabela 10.3 – Efeitos do tratamento com micro-ondas associado a ácido e glicerol

Soluções de glicerol	Solução após pré-tratamento com micro-ondas (2 min.)		Hidrolisado enzimático (Power cell-prozin)
	Compostos fenólicos (mg/g bagaço)	Açúcares redutores (m/g bagaço)	Açúcares redutores (mg/g bagaço)
Glicerol 100% + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01M	33,0 ± 2,0	4,9 ± 0,9	512,9 ± 7,0
Glicerol 70% + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01M	17 ± 0,4	11,7 ± 0,8	356,9 ± 6,0
Glicerol 30% + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01M	0,95 ± 0,8	2,2 ± 0,2	195,6 ± 4,0
Glicerol 10% + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01M	0,74 ± 0,1	1,5 ± 0,1	234,2 ± 2,0
Glicerol 100% + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05M	62,4 ± 0,3	16,2 ± 0,9	377,3 ± 10,0
Glicerol 70% + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05M	23,3 ± 0,2	20,91 ± 0,8	256 ± 5,3
Glicerol 30% + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05M	5,5 ± 0,5	0	195,4 ± 6,0
Glicerol 10% + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05M	1,41 ± 0,4	9,09 ± 1,0	176,9 ± 5,0

Fonte: Magalhães, 2011.

### Radiação ionizante

A radiação ionizante (raios gama) provém do decaimento espontâneo por emissão beta de radionuclídeos, como, por exemplo, o Cobalto-60, e é considerada segura, uma vez que alimentos são irradiados com esta forma de energia para aumentar seu tempo de prateleira bem como instrumentos médicos são esterilizados sob seus efeitos. É uma via muito promissora para

degradação da celulose em carboidratos mais susceptíveis à ação microbiana e pode ser também aplicada sobre leito móvel o que permite processos em fluxo contínuo.

O bagaço de cana submetido à radiação ionizante em meio alcalino apresentou uma solubilidade em água de 79% e um teor total de açúcares solúveis de 46%, sendo 78% de trissacarídeos, 16% dissacarídeos e 6% monossacarídeos, contrastando com a amostra-controle que teve apenas 7% de sua massa solubilizada e 0,4% de açúcares solúveis. Também foram observadas alterações químicas na estrutura de materiais celulósicos submetidos à radiação ionizante como escurecimento e aumento da higroscopicidade. Estas alterações estão mais relacionadas a um efeito ionizante diretamente na fibra e não à geração de radicais hidroxilas provenientes da água (Bouchard et al., 2006).

### **Ozonólise**

O ozônio pode ser empregado como promotor de solvência de lignina com liberação de compostos fenólicos de baixo peso molecular. Dentre os polímeros constituintes dos materiais lignocelulósicos, a lignina é a mais susceptível à solubilização por ozonólise (Quesada et al., 1999). Em estudo realizado com resíduos de algodão foi provado que os teores de compostos fenólicos monoméricos solúveis aumentaram em 100% com a utilização de ozônio e que o teor de glicose aumentou de 3,0 para 10,0 g/100g de matéria seca após a aplicação de celulases. O tratamento com ozônio aumentou em 54% o teor de açúcares fermentescíveis após ação enzimática sobre a palha de arroz (Yosef et al., 1994).

## **Produção de enzimas para aplicação na sacarificação de material lignocelulósico: aspectos gerais da fermentação em estado sólido (FES) e a produção de enzimas em biorreatores**

O uso de enzimas despolimerizantes na sacarificação de resíduos agroindustriais para produção de etanol celulósico leva a duas questões importantes: a necessidade de desenvolver a tecnologia de produção de enzimas no Brasil e redução dos custos das mesmas.

Nesse aspecto, dentre os processos usados para a produção de enzimas, a fermentação em estado sólido (FES) é atrativa principalmente pela possibilidade do uso de meio à base de resíduos sólidos agrícolas e agroindustriais para crescimento do microrganismo (Gomes et al., 2005, Silva et al., 2005). Tais resíduos têm mostrado bons resultados na produção de enzimas como pectinases (Martins et al., 2002), celulases, xilanases (Leite et al. 2007; 2008), amilases (Ramalho, 2002), ligninases (Xavier-Santos, 2003), inulinases (Bender et al., 2005), quitinases (Binod et al., 2006) e fitases (Roopeh, 2006).

Esta técnica pode tornar-se economicamente vantajosa para os países subdesenvolvidos, ou em fase de crescimento, onde a dificuldade econômica atual e a globalização da economia mundial não permitem que todo o setor agropecuário acompanhe evolução biotecnológica. Estes processos seriam uma oportunidade ímpar se for considerada a possibilidade de se acoplar a produção de enzimas ao sistema de produção de etanol de cana e celulósico, de modo que os resíduos gerados na produção da cana e na indústria possam ser utilizados como substratos.

A FES pode ser definida como um processo que ocorre na ausência, ou próximo da ausência, de líquido nos espaços entre as partículas (Lonsane et al., 1985). Neste sistema, a água pode estar adsorvida sobre a superfície do sólido e/ou estar retida por capilaridade entre as partículas, mas não pode preencher totalmente os poros. As características higroscópicas do sólido, as propriedades da solução aquosa, a geometria das partículas e a porosidade do meio definem a capacidade de retenção de líquido no meio sólido. Estudos FES em reator de coluna realizados por Zanelato (2011) demonstraram que farelo de trigo adsorve mais água a uma taxa mais elevada do que bagaço de cana. Desse modo, a adição de água ao meio a ser fermentado deve levar em consideração o tipo do material que está sendo hidratado. Na fermentação submersa (FSM), os sólidos, fase dispersa, estão em solução no líquido, fase contínua, sendo que as reações ocorrem nesta última fase.

Em geral, o crescimento e o metabolismo microbianos dependem de altas quantidades de água para a dissolução e difusão de solutos, substratos e metabolitos, enquanto as trocas gasosas, basicamente de  $O_2$  e  $CO_2$ , podem ocorrer tanto na fase líquida como na gasosa, sendo mais eficientes nesta última. Portanto, há um equilíbrio delicado entre as porções sólida, líquida e gasosa para atender aos requisitos metabólicos do microrganismo, de modo

que estudos extensivos devem ser realizados para encontrar a proporção ótima de cada uma das fases (Gervais et al., 1996).

Na FSM, há maior homogeneidade dos constituintes do processo (microrganismo, nutrientes e metabolitos) e, conseqüentemente, o controle dos parâmetros de fermentação é mais simples e direto, resultando em maior padronização dos produtos (Gomes et al., 2009). Por outro lado, na FES há heterogeneidade do meio de cultivo e o controle de processo é deficiente, resultando em grande variabilidade de concentração de produtos, o que representa o maior entrave à aplicação industrial desta técnica. Para minimizar tal heterogeneidade, podem-se usar sistemas de mistura do meio de cultivo, microrganismos com maior capacidade de colonização do meio poroso, como fungos filamentosos, e aeração forçada, para prover  $O_2$ , remover  $CO_2$  e dissipar calor (Gervais; Molin, 2003).

De um modo geral, fungos filamentosos adaptam-se melhor à FES do que bactérias ou leveduras. Por causa de sua estrutura em filamentos, esses microrganismos penetram por entre e/ou dentro das partículas por erosão do substrato sólido, causada pela liberação de enzimas fibrolíticas pela ponta da hifa. Além disso, podem crescer em menor atividade de água ( $a_w$ ). Entretanto, trabalhos têm mostrado resultados satisfatórios de obtenção de diferentes produtos utilizando culturas bacterianas (Soares et al., 1999).

O material sólido usado na FES pode ser inerte, servindo de suporte à solução nutriente e/ou como fontes de carbono e nutrientes. Neste último caso, na medida em que o sólido é consumido, o micélio fúngico adquire a função de estruturar o meio e evitar o colapso da matriz porosa. Eventualmente, um suporte inerte pode ser empregado em conjunto com substratos sólidos para evitar aglomeração das partículas e conseqüente redução de aeração e dificuldade de remoção de calor metabólico conforme demonstrado por Silva et al. (2002) e por Martins et al. (2002). Em geral, os materiais sólidos empregados em FES são compostos naturais, tais como resíduos agrícolas, agroindustriais e de atividade urbana, agregando valor a materiais que frequentemente são descartados inadequadamente (Pandey, 2003; Economou et al., 2010).

A inexistência de água nos poros entre as partículas influencia todos os aspectos da fisiologia do microrganismo, como crescimento vegetativo, esporulação e germinação de esporos, além da produção e características dos metabolitos. Esporos de fungos produzidos em FES são mais estáveis,

mais resistentes à desidratação e têm maior taxa de germinação após longos períodos de congelamento do que os obtidos em FSM (Hölker; Lenz, 2005). Essas propriedades são atribuídas ao fato de os conidióforos obtidos em FES terem maior hidrofobicidade, parede celular mais rígida e menor volume (Munoz et al., 1995; Pascual et al., 2000).

Fungos cultivados em FES tendem a acumular polióis em suas células, como glicerol, manitol, eritrol e arabitol, sendo a composição desta mistura dependente das condições de cultivo (Adler et al. 1985; Ruijter et al., 2004; Arakaki et al., 2011). A produção destes metabolitos é o resultado de um mecanismo desenvolvido para manter a pressão de turgor das células, demonstrando a adaptação do microrganismo ao acesso limitado à água.

Outro fator importante a ser considerado em FES é a aeração, que assume várias funções: oxigenação, remoção do  $\text{CO}_2$ , dispersão de calor e distribuição de componentes voláteis metabolizados. No entanto, a remoção de umidade do meio é um aspecto deletério da aeração, pois, mesmo que o ar entre saturado no sistema, a elevação de temperatura decorrente da geração de calor metabólico torna-o insaturado, causando um desequilíbrio termodinâmico que é restaurado pela remoção de água das partículas sólidas (Umza-Guez et al., 2009).

A taxa de aeração depende dos requisitos de  $\text{O}_2$  do microrganismo para a metabolização de determinado produto e da remoção de  $\text{CO}_2$ , da taxa dissipação de calor metabólico gerado, do ressecamento da fase sólida e da estrutura física do meio poroso, devendo ser otimizada para cada tipo de meio, microrganismo e processo (Chahal, 1987). Restrições na oferta de  $\text{O}_2$  podem afetar a morfologia de fungos e a produção de metabolitos. O crescimento das hifas individuais de *A. oryzae* não foi influenciado para concentrações de  $\text{O}_2$  de até 0,25%, mas a taxa de crescimento específico total decresceu, bem como a produção de  $\alpha$ -amilase (Rahardjo et al., 2005). Por outro lado, a produção de flavorizantes por *Kluveromyces marxianus* foi relacionada à baixa disponibilidade de oxigênio, resultando na produção de aromas variados, tais como álcoois, aldeídos e cetonas (Medeiros et al., 2001).

Uma grande limitação da FES é a dificuldade de remoção do calor gerado pelo metabolismo do microrganismo em função da baixa condutividade térmica efetiva do meio poroso. Na prática, a FES necessita mais de aeração como veículo de dissipação de calor do que para suprimento de  $\text{O}_2$  (Vies-



turs et al., 1981). O aumento excessivo da temperatura em um biorreator provoca alterações nos mecanismos fisiológicos dos microrganismos, podendo levar à queda no rendimento dos produtos almejados e até à morte das células. Eventualmente, pode ocorrer a desnaturação do produto, principalmente de substâncias termolábeis. Esses problemas podem ser contornados com uso de microrganismos termofílicos. Na produção de pectinases por *Thermomucor indiciae-seudaticae* em FES usando fermentador de coluna Umza-Guez (2009) demonstrou-se que o aumento da temperatura decorrente do calor gerado pelo metabolismo do fungo não interferiu nas taxas de crescimento e de produção da enzima, não requerendo, portanto, sistema de resfriamento. Esse dado é importante do ponto de vista de escalonamento, visto que contorna um dos grandes problemas da FES com microrganismos mesofílicos.

De um modo geral, a concentração de enzimas em FES é maior do que em FSM (Aguilar et al., 2004). A produção máxima de poligalacturonase e xilanase por *Trichoderma viridae* ocorreu a  $a_w$  de 0,99, enquanto a síntese de  $\beta$ -glicosidase foi aumentada em  $a_w$  de 0,96 a 0,98 (Grajek, Gervais, 1987). Esse perfil tem sido relatado para a produção de diferentes grupos de enzimas e microrganismos. Xilanases, celulasas e pectinases foram produzidas em maior quantidade em FES do que em FSM por *Curvularia inaequalis* (Gomes et al., 2001), *Penicillium* spp. (Silva et al. 2002, Martin et al., 2004, Ferreira et al., 2010) *Thermoascus auraniacus* (Martins et al., 2002, Marchione et al., 2007) e *Aspergillus* sp. (Freitas et al., 2006). Embora vários autores tenham relatado menor produção de protease em FES, uma enzima frequentemente associada ao decaimento da produção de outras enzimas em FSM (Auria et al., 1990; Viniestra-González et al., 2003) Zanthorlin et al. (2010), demonstraram que o fungo termofílico *Myceliophthora* sp. produziu maior quantidade de protease em FES do que em FSM.

Contudo, é necessário ter cautela quanto aos estudos comparativos entre FES e FSM, para que conclusões parciais não sejam aceitas como absolutas. Estudos da produção de invertase e pectinase por *A. niger* mostraram que o fungo cresceu mais eficientemente e produziu mais enzimas em FES do que em FSM; apenas nesta última havia alta concentração de sacarose, indicando que a produção de enzimas é mais sensível à repressão catabólica em FSM (Aguilar et al., 2001; Viniestra-González et al., 2003). Entretanto, a repressão catabólica também pode ser exercida em FES. Dados de Silva et

al. (2002) demonstraram que o uso de cascas de frutas contendo altos teores de açúcares na produção de pectinases em FES resultou em forte repressão da produção da enzima quando comparado a meio contendo açúcares em baixas concentrações.

As características físico-químicas de enzimas também podem ser afetadas pela forma de cultivo microbiano. Acuña-Argüelles et al. (1994) compararam as propriedades de endo e exo-PG produzidas por *A. niger* em FES e verificaram que estas enzimas foram acentuadamente mais termoestáveis do que as similares produzidas em FSM. A endo-PG mostrou-se mais estável em faixas mais amplas de pH do que enzima de FSM. Da mesma forma, exo-PG produzida por *Penicillium veiridicatum* RFC3 em FES foi mais termoestável do que a equivalente produzida em FSM (Silva et al., 2007). Entretanto, estudos com fungos termofílicos levaram a resultados opostos. Martins et al. (2007) demonstraram que PG de *Thermoascus auranticaeus* CBMAI-756 produzida em FES foi menos termoestável que a obtida por FSM. Os mesmos resultados foram descritos por Martins et al. (2010) e Gomes et al. (2011), dados ainda não publicados) para PG de *Thermomucor indiciae-seudaticae* e *Rhizomucor pusillus*. O maior nível de glicosilação determinado para as enzimas produzidas em FSM foi considerado um fator provável da maior termoestabilidade dessas enzimas.

Várias outras vantagens da FES podem ser citadas em relação à convencional FSM, tais como: maior produtividade; semelhança com o habitat natural dos fungos filamentosos, que se adaptam mais facilmente ao meio de cultivo, permitindo o uso de microrganismos selvagens, que apresentam melhor performance do que cepas geneticamente modificadas; etapas posteriores mais simples em função da maior concentração do produto; menor gasto energético; e menores requisitos de tratamentos de resíduos. Algumas desvantagens são: problemas com aumento de escala; as dificuldades no controle de parâmetros do processo, como pH, temperatura, fornecimento de nutrientes e umidade; alta impureza do produto, uma vez que a degradação do material sólido e a atividade microbiana podem gerar metabólitos indesejados de difícil separação e que podem provocar dificuldades nos procedimentos posteriores à fermentação. Deste modo, a FES, apesar de sua grande potencialidade, necessita de estudos microbiológicos, bioquímicos e de engenharia mais profundos para que possa ser aplicada em larga escala industrial (Saiz-Jimenez, 1995).

Como anteriormente mencionado, a FES é particularmente atrativa pela possibilidade do uso de resíduos sólidos agrícolas e agroindustriais de baixo valor. Tais resíduos têm mostrado bons resultados na produção de enzimas como descrito anteriormente. No cenário de produção de biocombustíveis, a FES é economicamente vantajosa para produção de enzimas despolimerizantes de materiais lignocelulósicos (Hsieh, Yang, 2004; Ito et al., 2011).

A grande maioria dos trabalhos publicados sobre FES trata de aspectos microbiológicos e/ou bioquímicos, sendo os experimentos realizados em frascos de vidro ou sacos plásticos. A transposição dos resultados obtidos nestes trabalhos para a escala de biorreatores não é trivial e requer experimentos específicos, uma vez que nos frascos de vidro as condições de temperatura, umidade e pH são homogêneas e facilmente controladas, enquanto nos biorreatores o controle é muito mais complexo.

Os fermentadores para FES podem ser divididos em duas classes básicas: os de leito fixo e os de leito móvel. Os primeiros podem ser subdivididos em de bandeja e os de colunas de leito empacotado, enquanto os de leito móvel, em de leito fluidizado e rotativos. Para a escolha do projeto ideal devem ser considerados os objetivos da fermentação, custos envolvidos no processo, facilidade de carga e descarga, limpeza e manutenção, possibilidade de monitoramento e controle dos parâmetros do processo, características do microrganismo empregado e necessidade ou não de sistema estéril. É importante que o reator seja construído com material inócuo, resistente à corrosão e não tóxico para os organismos. Além disso, deve promover aeração eficiente e manter a uniformidade e integridade do substrato (Raghavarao et al., 2003). Ao contrário da FSM, poucos são os fabricantes que dispõem de fermentadores para FES em linha, sendo os projetos quase customizados para o trinômio substrato-microrganismo-produto.

Nos biorreatores de bandeja, o ar escoar paralelamente à superfície do meio fermentativo, enquanto nos de leito empacotado, o ar percola a matriz porosa. A camada de sólidos nas bandejas não pode ultrapassar alguns poucos centímetros para evitar o acúmulo de energia térmica, que é insuficientemente removida pelo ar que escoar na superfície (Sato; Sudo, 1999). Desse modo, sistemas industriais que empregam esta alternativa de cultivo, tais como a de produção de *koji* no Japão, requerem grandes áreas e mão de obra extensiva, de modo que os custos de instalação e operacionais são elevados. Um caso particular dos biorreatores em leitos estáticos é o da produção de

esporos de fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae*, que ocorre industrialmente em sacos plásticos com até 1 kg de substrato. Neste processo, o meio de cultivo, em geral arroz, é inoculado com a suspensão fúngica, acondicionado em sacos plásticos e mantido em salas com temperatura, umidade e luminosidade controladas. Estas são técnicas muito artesanais e aspectos de engenharia são relegados a plano secundário.

Os fermentadores de leite empacotado têm projeto simples, são de fácil operação, requerem pouco espaço e baixo consumo de mão de obra. Os controles das variáveis de processo são mais eficientes do que no fermentador de bandejas (Ashley et al., 1999). Estes biorreatores são tubos verticais encamisados, por onde circula água à temperatura desejada; o meio poroso previamente inoculado é acomodado no interior da coluna e ar percola longitudinalmente o sistema. São particularmente recomendados a microrganismos intolerantes à agitação, como fungos de hifas cenocíticas e mesmo alguns de hifas septadas.

Nesta classe de biorreatores, o oxigênio não é fator limitante, por causa da aeração forçada, desde que não haja colapso e aglomeração do meio poroso ao longo da fermentação. Para os casos onde aglomeração é previsível, um material fibroso inerte pode ser empregado para estruturar a matriz porosa, como fez Umsza-Guez (2009) no cultivo de *Thermomucor indicae-se-daticae* N31 nos substratos farelo de trigo e bagaço de laranja, tendo bagaço de cana-de-açúcar como inerte.

A grande desvantagem deste projeto é a remoção deficiente de calor metabólico gerado pelo microrganismo, que provoca ressecamento do meio e heterogeneidade na produção dos metabolitos (Rahardjo et al., 2006). As taxas de reação e os equilíbrios químicos no fermentador são fortemente dependentes da temperatura do sistema. Assim, experimentos que se desenvolvem satisfatoriamente em escala de frascos podem não ser bem-sucedidos neste biorreatores. Nos períodos de maior atividade metabólica, o aumento de temperatura pode superar em 10°C a temperatura ótima da fermentação (Lonsane et al., 1992; Khanahmadi et al., 2006).

O controle da temperatura em leitos empacotados fica restrito a ações sobre a velocidade e a temperatura do ar e sobre a temperatura da camisa. Ambas alternativas são pouco eficientes, uma vez que o ar tem baixa capacidade calorífica e a dispersão condutiva de calor é deficiente em função da baixa condutividade térmica efetiva do substrato sólido. O mecanismo

mais efetivo de controle de temperatura seria a remoção de calor evaporativo (Gutierrez-Rojas et al., 1996). Para tanto, ar com umidade abaixo da saturação poderia ser empregado e, para restabelecer o equilíbrio termodinâmico, água seria vaporizada do material sólido, um processo endotérmico. No entanto, por conta da impossibilidade de repor a água evaporada do meio, esta alternativa leva ao ressecamento do substrato e a todos os efeitos deletérios a ele associados.

Alguns autores observaram um perfil de umidade no interior da coluna, crescente da base para o topo do leito (Lonsane et al., 1992; Umsza-Guez, 2009). Nas proximidades da entrada do ar no leito houve ressecamento e nas proximidades da saída houve inundação, e ambos os fenômenos afetaram negativamente a produção de enzimas, uma vez que nas porções mais centrais do biorreator a produção de enzimas foi maior do que nas extremidades. A queda de umidade na entrada deve-se ao efeito da remoção de calor evaporativo já comentado, e a inundação na saída ao fato de o ar sair saturado do fermentador e deparar-se com o ambiente a uma temperatura mais baixa, condensando o excesso de umidade, que retorna ao leito. A água então ocupa os poros e dificulta as trocas gasosas, afetando o metabolismo microbiano.

Em reatores de leito fixo de grande porte, a tendência é que estas heterogeneidades de processo e de produtos se acentuem, sendo necessárias alternativas tecnológicas para superá-las.

O fermentador de leito móvel mais pesquisado na literatura é o de tambor rotativo, pois apresenta boas alternativas de controle de temperatura e de umidade do meio. Neste projeto, o contato fluido-partícula é intenso, conferindo grande homogeneidade térmica ao sistema, favorecendo a padronização das condições de processo e dos produtos. O projeto deste sistema é mais complexo do que o dos reatores de leito empacotado, assim como os requisitos de manutenção, resultando em custos mais elevados de execução e de operação.

A operação destes biorreatores não implica rotação contínua do tambor, que normalmente tem rotação intermitente. Quando estacionário, este sistema assemelha-se ao reator de bandejas, pois ar é introduzido no equipamento no sobre-espaço acima do material sólido e nesta alternativa de operação a remoção de calor metabólico é limitada (Mitchell et al., 2000). No entanto, enquanto o meio sólido é revolvido, água pode ser aspergida sobre

o mesmo, de modo que ar pode ser empregado com umidades relativas moderadamente baixas, removendo calor evaporativo, sem que o meio torne-se ressecado. Evidentemente, a tolerância do microrganismo ao cisalhamento deve ser testada *a priori*, antes do projeto definitivo do equipamento, o que pode ser feito em frascos de vidros aerados a serem girados periodicamente ao longo da fermentação, comparando-se o resultado final com colunas estáticas assumidas como controle (Van de Lagemaat; Pyle, 2001).

Vários produtos têm sido obtidos com sucesso em fermentadores de tambor rotativos, principalmente enzimas, tais como celulasas e hemicelulasas por *Thermoascus auranticus* em palha de trigo, celulasas por *Trichoderma harzianum* em fibras de palma, xilanase e exo-PG por *A. awamori* em polpa de uvas e amilases por *A. awamori*, em torta de babaçu (Kalogeris et al., 1999; Díaz et al., 2009). No entanto, alguns produtos, como pigmentos por *Monascus* sp. em arroz e tanases por *Penicillium glabrum* em fibra sintética embebida em solução inoculante, não deram resultados satisfatórios (Van de Lagemaat; Pyle, 2001; Eduardo, 2010). Na produção de pigmentos, o processo foi muito longo, cerca de doze dias, levando à desestruturação do meio e à aeração inadequada do sistema, enquanto na produção das enzimas, o sistema projetado implicava rotação contínua, causando sérios danos ao micélio fúngico.

## Conclusão

Existem ainda muitos obstáculos a serem vencidos para conseguir altos rendimentos no processo de obtenção de açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática, como o custo das enzimas e a recalcitrância do bagaço. A cristalinidade da celulose e a lignina, que dificultam o acesso das enzimas às fibras celulósicas, são obstáculos que podem ser superados com pré-tratamentos físicos e/ou químicos do bagaço. Entretanto, alguns fatores devem ser considerados para a escolha do tratamento ao qual o bagaço será submetido: rendimento econômico, segurança operacional, consumo energético e geração de resíduos.

O custo das enzimas pode ser reduzido com processos de produção alternativos, como a fermentação em estado sólido usando resíduos agrícolas ou agroindustriais como substratos para cultivo dos fungos produtores.

## Referências bibliográficas

- ABEER, M. A. et al. Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part I. Acid catalyzed hydrolysis. *Bioresource Technology*, v.101, n.12, p.4446-55, 2010.
- ABRAHÃO, M. C. et al. Ligninolytic activity from newly isolated basidiomycete strains and effect of these enzymes on the azo dye orange ii decolorization. *Annals of Microbiology*, v.58, p.427-32, 2008.
- ACUÑA-ARGÜELLES, M. et al. Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. *Biotechnological Letters*, n.16, p.23-8, 1994.
- ADLER, L.; BLOMBERG, A.; NILSANO, A. Glycerol metabolism and ormo-regulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology*, v.162, p.300-6, 1985.
- AGUILAR, C. N. et al. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid state fermentations: influence of glucose and tannic acid. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.26, n.5, p.296-302, 2005.
- . et al. Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures. *Food Science and Biotechnology*, v.13, p.109-13, 2004.
- ALVES-PRADO, H. F. et al. Cellulolytic enzymes isolated from Brazilian areas: production, characterization and applications. In: *Cellulase: types and action, mechanism and uses*. Ed. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2010, p.178-206.
- . et al. Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian cerrado. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.161, n.1-8, p.333-46, 2010.
- ARAKAKI, R. L. et al. *Effects of sodium chloride concentrations of the culture medium on growth, ligninase production and herbicide degradation ability of basidiomycetes strains*, 2011 (sem publicação).
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, v.29, n.4, p.719-39, 2005.
- ASHLEY, V. M.; MITCHELL, D. A. E.; HOWES, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biochemistry Engineering Journal*, v.3, p.141-50, 1999.
- ATALLA, R. H.; ISOGAI, A. Cellulose. *Comprehensive natural products II*, v.6, p.493-539, Elsevier Ltd., 2010.
- AURIA, R. et al. Ion exchange resin: a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Technology*, v.4, n.391-6, 1990.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, v.30, n.2, p.215-42, 2010.
- BAYER, E. A. et al. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, v.58, p.521-54, 2004.

- . et al. Cellulosomes – Structure and ultrastructure. *Journal of Structural Biology*, v.124, n.2-3, p.221-34, 1998.
- BENDER, J. P.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, n.1, p.56-9, 2006.
- BIELY, P. et al. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal of Biotechnology*, v.57, p.151-66, 1997.
- BINOD, P. et al. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme Microbiology and Technology*, v.36, p.880-7, 2005.
- BOCCHINI, D. A.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon source for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v.40, n.12, p.3653-9, 2005.
- . et al. Effect of *Bacillus circulans* D1 thermostable xylanase on biobleaching of *Eucalyptus* kraft pulp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.105, n.1-3, p.393-401, 2003.
- BOCCHINI-MARTINS, D. A. et al. Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. In: *Waste Management*, book 2, 2011. (in press)
- BOISSET, C. et al. Digestion of crystalline cellulose substrates by the *Clostridium Thermocellum* cellulosome: Structural and morphological aspects. *Biochemical Journal*, v.340, n.3, p.829-35, 1999.
- BORASTON, A. B. et al. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*, v.382, n.3, p.769-81, 2004.
- BOUCHARD, J. N.; ROY, S.; CAMPBELL, D. A. UVB effects on the photo system II-D1 protein of phytoplankton and natural phytoplankton communities. *Photochemistry and Photobiology*, v.82, p.936-51, 2006.
- BOUCHARD, J.; MÉTHOT, M.; JORDAN, B. The effects of ionizing radiation on the cellulose of woodfree paper. *Cellulose*, v.13, n.5, p.601-10, 2010.
- BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Extraction and characterization of hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, v.79, p.17-25, 2010
- CHAHAL, D. S. Growth characteristics in solid state fermentation for upgrading of protein values of lignocelluloses and cellulases production. *American Chemistry Society Symposium*, v.207, p.421-42, 1987.
- CHAVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology*, v.123, p.413-33, 2006.
- CHORNET, E.; OVEREND, R. P. Phenomenological kinetics and reactions engineering aspects of aqueous treatments. In: FOCHER, B.; MARZETTI, A.; CRESCENZI, V. (Eds.). *Steam-explosion techniques fundamentals principles and industrial applications*. Philadelphia: Gordon and Breach Science Publishers, p.21-58.
- COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANIZATION (CSIRO), Australia, 1988.



- CONESSA, A.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*, v.93, n.2, p.143-58, 2002.
- DA-SILVA, R.; GOMES, E. Ninases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Org.). *Enzimas como Agentes Biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004, p.349-79, 2004.
- . et al. Production of xylanase and CMCase on Solid State Fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.36, p.235-41, 2005.
- DAVIES G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolyses. *Structure*, v.3, p.853-9, 1995.
- DEY, P. M.; BRINSON, K. Plant Cell Walls. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v.42, p.265-94, 1984.
- DÍAZ, A. B et al. Solid state fermentation in a rotating drum bioreactor for the production of hydrolytic enzymes. *Chemical Engineering Transactions*, v.17, p.1041-6, 2009.
- DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential application of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, v.28, n.2, p.83-99, 2000.
- . et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p.907-31, 2002.
- ECONOMOU, CH. N. et al. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. *Bioresource Technology*, v.101, n.4, p.1385-8, 2010.
- EDUARDO, M. P. *Desempenho e homogeneidade de cultivos em meio sólido de Monascus sp. em biorreator do tipo tambor com agitação interna*: efeitos do padrão de agitação. São Paulo, 2010. 144p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo (USP).
- EVANS, C. S et al. Enzymes and small molecular. *FEMS Microbiology Reviews*, p.235-9, 1994.
- FERREIRA, V. et al. Production of pectate lyase by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state and submerged fermentation. *International Journal of Microbiology*, v.2010, p.1-8, 2010.
- FLINT, J. et al. Ligand-mediated dimerization of a carbohydrate-binding module reveals a novel mechanism for protein-carbohydrate recognition. *Journal of Molecular Biology*, v.337, p.417-26, 2004.
- FODY, A. *Optimization of steam explosion pretreatment*: Final report DOE/ET/23060-1. US. Department of Energy, Fuels from Biomass Program by Iotech Corp. Tawa, Ontario, 1980.
- FONTES, C. M.; GILBERT, H. J. Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annual Review of Biochemistry*, v.79, p.655-81, 2010.

- FREITAS, P. M et al. Production and partial characterization of polygalacturonase by thermophilica *Monascus* sp N8 and *Aspergillus* sp. N12 on solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p.302-6, 2006.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal*, v.13, p.85-101, 2003.
- GERVAIS, P.; MARCHAL, P. A.; MOLIN, P. Water relations of solid state fermentation. *Journal of Science and Industry Researches*, v.55, p.343-57, 1996.
- GIRIO, F. M et al. Hemicellulose for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, v.101, p.47-75, 2010.
- GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. Biomass, In: \_\_\_\_\_. *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: Cambridge University Press, p.430-55, 2007.
- GOMES, E.; SILVA, R. da; IEMBO, T. Production, characterization and properties of depolymerizing enzymes from *Curvularia inaequalis* strains. *Folia Microbiologica*, v.46, p.303-8, 2001.
- \_\_\_\_\_. et al. Production of thermostable glucoamylase by *Aspergillus flavus* A1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A 13.37. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.36, p.75-82, 2005.
- \_\_\_\_\_. et al. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, p.31-9, 2009.
- \_\_\_\_\_. et al. Purification of an Exopolygalacturonase from *Penicillium viridicatum* RFC3 produced in submerged fermentation. *International Journal of Microbiology*, v.2009, p.1-9, 2009.
- GRAJEK, W.; GERVAIS, P. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activity produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. *Enzyme Microbiology and Technology*, v.9, p.658-62, 1987.
- GRAMINHA, E. B. N. et al. Enzyme production by solid-state fermentation: Application in animal nutrition – Review. *Animal Feed Science and Technology*, v.144, p.1-22, 2008.
- GUTIERREZ-ROJAS, M. et al. Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochemistry*, n.31, p.363-9, 1996.
- HAMMEL, K. E., CULLEN, D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*, n.11, p.349-55, 2008.
- HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, v.30, p.454-66, 2002.
- HÖLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.64, p.175-86, 2004.
- HISIEH, C.; YANG, F.-C. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*, v.91, p.105-9, 2004.

- IEMBO, T.; SILVA, R.; GOMES, E. Production, characterization and properties of B-glucosidase and B-xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.38, p.549-54, 2002.
- ITO K. et al. Uniform culture in solid-state fermentation with fungi and its efficient enzyme production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.111, n.3, p.300-5, 2011.
- JOHNSON, E. A.; MADIA, A.; DEMAIN, A. L. Chemically Defined minimal medium for the growth of the anaerobic cellulolytic thermophile *Clostridiumthermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.41, p.1060-2, 1981.
- JOHNSON, E. A. et al. Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridiumthermocellum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.43, p.1125-32, 1982.
- JØRGENSEN, H. et al. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioproducts and Biorefining-Biofpr*, v.1, p.119-34, 2007.
- JUNG, H. G.; ALLEN, M. S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *Journal Animal Science*, v.73, p.2774-90, 1995.
- JUNG, H. J. G.; HIMMELSBACH, D. S. Isolation and characterization of wheat strow lignin. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v.37, p.81-7, 1989.
- JUNG, H. G. et al. Cell wall composition and degradability of forage stems following chemical and biological delignification. *Journal of Science Food Agricultural*, v.58, p.347-50, 1992.
- KALOGERIS, E. et al. Design of a solid state fermentation bioreactor for thermophilic microorganisms. *Bioresource Technology*, v.67, p.313-5, 1999.
- KHANAHMADI, M. et al. Bed moisture estimation by monitoring of air stream temperature rise in packed-bed solid-state fermentation. *Chemical Engineering Science*, v.61, p.5354-63, 2006.
- LAMED, R. et al. The Cellulosome: A discrete cell surface organelle of *Clostridiumthermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. *Biotechnology and Bioengineering*, v.13, p.63-181, 1983.
- LEITE, R. S. R.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* on solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.136-14, p.281-8, 2007.
- \_\_\_\_\_. et al. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -Glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, v.43, p.391-5, 2008.
- LEONOWICZ, A. et al. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v.27, p.175-85, 1999.
- LI, X. L.; CHEN, H.; LJUNGDAHL, L. G. Two cellulases, CelA and CelC, from the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* Strain PC-2 Contain n-terminal docking

- domains for a cellulase-hemicellulase complex. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p.4721-8, 1997.
- LONSANE, B. K. et al. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microbiology and Technology*, v.7, n.258-65, 1985.
- \_\_\_\_\_. et al. Scale-up strategies for solid-state fermentation systems. *Process Biochemistry*, v.27, p.259-73, 1992.
- LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.66, n.3, p.506-77, 2002.
- MAGALHÃES, T. S. *Estudo de pré-tratamentos de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol celulósico*. São José do Rio Preto, 2011. Tese (Mestrado em Química) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp).
- MAKI, M.; LEUNG, K. T.; QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences*, v.29, n.5, p.500-16, 2009.
- MARCCHIONE, M. M. et al. Protease production by different thermophile fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.146, p.223-30, 2007.
- MARTIN, N. et al. Pectinase production by fungi strains in solid fermentation using agro-industrial by product. *Archives of Biology and Technology*, v.47, p.813-9, 2004.
- \_\_\_\_\_. et al. Pectinase production by a brazilian thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in solid-state and submerged fermentation. *Microbiology*, v.79, p.306-13, 2010.
- MARTINS, E. S. et al. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v.37, p.949-54, 2002.
- \_\_\_\_\_. Purification and characterization of polygalacturonase produced by *Thermoascus aurantiacus* 179-5 in submerged fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.91, p.291-9, 2007.
- \_\_\_\_\_. Pectinase production from *Penicillium veridicatum* Rfc3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-product. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, p.318-24, 2002.
- MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, v.60, n.6, p.551-65, 2002.
- MEDEIROS, A. et al. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation on packed bed column bioreactor. *World Journal Microbiology and Technology*, v.17, p.767-71, 2001.
- MESTERET, T.; JONG, E.; FIELD, J. A. Manganese regulation of veratryl alcohol in white rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n.5, p.1881-7, 1995.
- MITCHELL, D. A. et al. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process Biochemistry*, v.35, p.1211-25, 2000.
- MOREIRA NETO, S. L.; MATHEUS, D. R.; GOMES MACHADO, K. M. Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolourization by tropical basidiomycetes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.52, p.1075-82, 2009.

- MUNOZ, G. A. et al. Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbial Letters*, v.125, p.63-70, 1995.
- NORDON, R. E.; CRAIG, S. J.; FOONG, F. C. Molecular engineering of the cellulosome complex for affinity and bioenergy applications. *Biotechnology Letters*, v.31, n.4, p.465-76, 2009.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa: revisão. *Química Nova*, v.33, n.7, p.1549-58, 2010.
- QUESADA, J.; RUBIO, M.; GOMÉZ, D. Ozonation of lignin rich solid fractions from corn stalks. *Journal of Wood Technology*, v.19, p.115-37, 1999.
- PASCUAL, S. et al. Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged cultures. *Journal of Applied Microbiology*, v.89, p.847-53, 2000.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal*, v.13, p.81-4. 2003.
- PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. Utilização de resíduos culturais e de beneficiamento na alimentação de bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS 6, 1995, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: FEALQ, 1995. 291p.
- PÉREZ, S.; SAMIN, D. Structure and engineering of cellulose, p25-116. In: HORTON, D. (Ed.). *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Washington: The American University, 2010. (v.64)
- POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.57, n.1-2, p.20-33, 2001.
- POLLET, A; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.30, p.176-91, 2010.
- PRADO, A. H. F. et al. Cellulolytic enzymes isolated from brazilian areas: production, characterization and applications. In: GOLAN, A. E. (Ed.). *Cellulase: Types and action, mechanism and uses*. New York: Nova Science Publishers Inc., 2010.
- RAGHAVARAO, K. S. M.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemistry Engineering Journal*, v.13, p.149-55, 2003.
- RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnology Advances*, v.24, p.161-79, 2006.
- RAHARDJO, Y. S. P. et al. Effects of low oxygen concentrations on growth and  $\alpha$ -amilase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. *Biomolecular Engineering*, v.21, p.163-72, 2005
- RAMALHO, A. P. *Produção de amilases por microrganismos termofílicos*. São José do Rio Preto, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp).
- ROOPESH, K. et al. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource Technology*, v.97, p.506-11, 2006.

- RUIJTER, G. J.; VISSER, J.; RINZEMA, A. Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. *Microbiology*, v.150, p.1095-101, 2004.
- SAIZ-JIMENEZ, C. Microbial melanin in stone monuments. *Science Total Environment*, v.167, p.273-86, 1995.
- SALOHEIMO, M. et al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry*, v.269, n.17, p.4202-11, 2002.
- SANDGREN, M.; HIBERG, J. Structural and biochemical studies of GH Family 12 Cellulases: improved thermal stability and ligand complexes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v.89, n.3, p.246-91, 2005.
- SATO, K.; SUDO, S. Small scale solid state fermentations. In: DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. E. (Eds.). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington, DC: ASM Press, p.61-79, 1999.
- SCHULTZ, T. P. M. et al. Steam explosion of mixed hardwood chips, rice hulls, corn stalks, and sugar cane bagasse. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.32, n.5, p.1166-72, 1984.
- SHOHAM, Y.; LAMED, R.; BAYER, E. A. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends in Microbiology*, v.7, n.7, p.275-81, 1999.
- SILVA, D. et al. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, v.42, p.1237-43, 2007.
- \_\_\_\_\_. et al. Production of pectinase by solid state fermentation with *Penicillium viridicatum* Efc3. *Process Biochemistry*, v.40, p.2835-40, 2005.
- SILVA, R. et al. Solid state fermentation of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v.37, p.949-54, 2002.
- SOARES, M. M. C. N. *Isolamento de linhagens microbianas produtoras de pectinases e caracterização das enzimas*. São José do Rio Preto, 1999. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp).
- SUN, R.; LAWThER, J. M.; BANKS, W. B. A tentative chemical structure of wheat straw lignin. *Industrial Crops and Products*, v.6, p.1-7, 1997.
- SUN, J. X. F. et al. Comparative study of lignins from ultrasonic irradiated sugar-cane bagasse. *Polymer International*, v.53, n.11, p.1711-21, 2004
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.17, n.1, p.39-67, 1997.
- TANAHASHI, M. Characterization and degradation mechanisms of wood components by steam explosion and utilization of exploded wood. *Wood Research*, v.77 p.49-117, 1990.
- TOPAKAS, E.; VAFIADI, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process. Biochemistry*, v.42, p.497-509, 2007.

- TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; LE BORGNE, S. potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis Environmental*, v.46, p.1-15, 2003.
- UMSZA-GUEZ, M. A. *Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo Thermomucor indiciae-seudaticae N31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo*. São José do Rio Preto, 2009. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp).
- VIESTURS, U. F. et al. Solid state fermentation of wheat straw with *Chaeromium cellulolyticum* and *Trichoderma lignorum*. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, v.11, p.359-69, 1981.
- VILLELA, S. M. *Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papeleiras*. Florianópolis, 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina.
- VINAEGRA-GONZÁLEZ, G. et al. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemistry Engineering Journal*, v.13, p.157-67, 2003.
- WHITNEY S. E.; GIDLEY M. J.; MCQUEEN-MASON S. J. Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites. *Plant Journal*, v.22, p.327-34, 2000
- WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.157, p.174-209, 2009.
- WOOD J.; WOOD P. Evidence that cellobiose: quinone oxoreductase from *Phanerochaete chrysosporium* is a breakdown products of cellobiose oxidase. *Biochemistry Biophysical Acta*, v.1119, p.90-6, 1992.
- WOOD, H. B. E.; ALDRICH, C.; INGRAM, L. O. ultrasound stimulates ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper. *Biotechnology Progress*, v.13, n.3, p.232-7, 1997
- XAVIER-SANTOS, S. et al. Screening for pectinolytic activity of wood-rotting Basidiomycetes and characterization of the enzymes. *Folia Microbiologica*, v.49, p.46-52, 2004.
- YOSEF, E. et al. Characterization of some cell wall components of untreated and ozone-treated cotton stalks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.42, n.1, p.86-90, 1994.
- ZANELATO, A. I. *Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo*. São José do Rio Preto, 2011. 113p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- ZANPHORLIN, L. M. et al. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *Journal of Microbiology*, v.48, p.331-6, 2010.
- ZHU, N. H. et al. Improved optical heterodyne methods for measuring frequency responses of photodetectors. *IEEE Journal of Quantum Electron*, v.42, n.3, p.241-8, 2006.

# 11

## Utilização de enzimas lipolíticas na produção de biodiesel

*Mariana R. Pereira,  
Thaís C. Maester, Lúcia M. Carareto Alves,  
Eliana G. M. Lemos*

### Introdução

As enzimas catalisam processos biotecnológicos e têm sido usadas por décadas, como por exemplo, na aplicação de leveduras para a fermentação do açúcar a álcool; na produção de vinhos e pães; em processos enzimáticos na indústria têxtil e alimentícia etc. (Aehle, 2004).

Recentemente, as propriedades catalisadoras destas enzimas estão sendo compreendidas corretamente e uma nova fase começou, na qual há a fusão de ideias de química proteica, biofísica molecular e biologia molecular. Contribuições sobre a bioquímica enzimática, cinética, estudos estruturais e potenciais biotecnológicos podem ser encontrados em livros, artigos e enciclopédias (ibidem). Neste capítulo, será discutida a nomenclatura das enzimas e suas relações, dando um enfoque à aplicação das enzimas lipolíticas para a produção de biodiesel, visto que o uso do biodiesel no Brasil tem atraído atenção por ser um combustível renovável, biodegradável e atóxico, propiciando o desenvolvimento de uma fonte energética sustentável. O biodiesel é composto de alquil ésteres de ácidos graxos e pode ser sintetizado por catalise química ou enzimática, principalmente a partir de fontes renováveis.

Dentro deste contexto, o uso de enzimas para produção de biodiesel tem recebido muita atenção uma vez que apresenta muitas vantagens sobre os métodos químicos: é realizado em condições de reação moderada, utiliza pouca quantidade de álcool, a recuperação do produto é mais fácil e o processo gera menor interferência ambiental (Kourist; Brundiek; Bornscheuer,



2010). Dentre estas enzimas, a aplicação de lipases para produção de biodiesel, a partir de óleos vegetais brutos, possibilita produzir um produto de alta pureza, proveniente de gorduras descartadas, pois atuam sobre ácidos graxos tanto livres quanto ligados à acilgliceróis.

Em função da intensa utilização de lipases na produção de biodiesel é necessária a identificação de novas enzimas lipolíticas que aumentem sua produção, sem resultar no custo elevado do produto final. Também é necessário que estas enzimas não sejam inativadas pela concentração do álcool, possuam elevada atividade, entre outras características. Várias propostas são viáveis para a busca de novas enzimas, sendo uma delas a abordagem metagenômica.

Esta abordagem foi proposta em 1998 e envolve a extração direta do DNA genômico de amostras do ambiente e clonagem do material obtido, resultando em complexas bibliotecas que apresentam várias aplicações como analisar a diversidade microbiana e identificar genes codificadores de proteínas de interesse biotecnológico (Chu et al., 2008; Couto et al., 2010; Lee et al., 2004; Ranjan et al., 2005; Rhee et al., 2005; Wu; Sun, 2009). Diversos estudos têm demonstrado que a análise metagenômica propicia uma combinação quase ilimitada para encontrar novos genes codificadores de lipases, como por exemplo, os genes que foram prospectados em bibliotecas metagenômicas advindas de diferentes amostras ambientais como: solo (Lee et al., 2004), água de lagoa e lago (Ranjan et al., 2005), de mar (Chu et al., 2008), de rio (Wu; Sun, 2009), sedimento de manguezais (Couto et al., 2010) e campos termais (Rhee et al., 2005).

Segundo Ranjan e colaboradores (2005), a busca incessante por lipases irá aumentar a diversidade desta enzima e, conseqüentemente, o número de famílias as quais estão classificadas. Por serem enzimas versáteis e amplamente utilizadas, a expectativa é que as lipases futuramente sejam tão importantes como catalisadores industriais, o quanto são atualmente as proteases e carboidrases (Trevisan, 2004). Como exemplo disso, é a grande atenção destinada a esta enzima para a produção de biodiesel, por meio da transesterificação de gorduras, uma alternativa do combustível petróleo para os problemas ambientais (Kourist; Brundiek; Bornscheuer, 2010).

## Diversidade de enzimas

Enzimas de diferentes organismos são usadas para aplicação industrial, tanto de sistema procariótico quanto de eucariótico. O primeiro abrange

famílias gram-negativas e gram-positivas. Já o segundo, inclui leveduras e fungos, assim como células de mamíferos e insetos, cujas enzimas são usadas em produtos biofarmacêuticos (Aehle, 2004).

Para vários casos envolvendo exploração de novas enzimas ocorre o estudo das estirpes para produzir enzimas de interesse, fato conciliado com a variedade de microrganismos existentes. Como exemplo, a bactéria *Bacillus licheniformis*, que secreta naturalmente protease alcalina, foi selecionada para produzir uma das primeiras enzimas comerciais, Subtilisin Carlsberg, para uso em detergentes. Várias outras estirpes produtoras de altos níveis de protease também foram selecionadas para aplicação industrial (ibidem).

Do fungo *Trichoderma* foi descoberto um complexo enzimático de celulase ácida que é capaz de decompor substrato de celulose em glicose, e esta aplicação está sendo utilizada no tratamento de matérias têxteis. Estudos constantes com este complexo enzimático são realizados a fim de verificar o potencial para degradação de celulose, e assim como para outros sistemas já descritos, novas estirpes são isoladas (ibidem).

Nestes exemplos, os microrganismos podem ser vistos como sistemas metabólicos que convertem substratos em massa celular e bioprodutos, e as enzimas atuam nestes sistemas a fim de catalisar diferentes reações (ibidem). Cada célula possui mecanismos regulatórios que atuam na síntese e atividade enzimática, permitindo à célula responder adequadamente a mudanças ambientais.

O processo básico de síntese enzimática envolve transcrição, tradução e processos pós-traducionais, este em organismos eucarióticos. Várias diferenças existem entre as várias classes de organismos, principalmente entre os procariontes e eucariontes. As enzimas diferem enormemente entre si quanto à massa celular, número de cadeias polipeptídicas, ponto isoelétrico e grau de glicosilação. E esta variedade na produção de enzimas ocorre entre as diferentes espécies (ibidem).

## Classificação enzimática

Na década de 1950, houve um crescimento rápido no número de enzimas conhecidas e a nomenclatura ficou inapropriada e confusa para abrangê-las. Assim, para algumas enzimas que desempenham diferentes reações, o nome frequentemente mencionava pouco ou quase nada sobre a natureza

da reação catalisada, além do que nomes similares foram dados a enzimas de tipos completamente diferentes.

Tendo em vista esta situação, no terceiro Congresso Internacional de Bioquímica, em Bruxelas em 1955, a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) decidiu criar o Comitê Internacional de Enzimas (*Enzyme Committee* – E. C.), sob orientação da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Por esta razão, cada enzima recebe então uma nomenclatura no formato EC X.Y.W.Z.

Como princípios gerais da nomenclatura, o primeiro consiste que a terminação *ase* deve ser usada em enzimas únicas e não deve ser aplicada em sistemas que usam mais de uma enzima. Portanto, quando desejar nomear um sistema em função da reação total catalisada por ele, a palavra *sistema* deve ser incluída no nome. O segundo princípio menciona que as enzimas devem ser nomeadas e classificadas de acordo com as reações que catalisam. Isto se refere a mudanças químicas resultantes da atuação da enzima e que são representadas em equações químicas, normalmente o mecanismo de ação e os cofatores intermediários não são incluídos no nome. Assim, a enzima não pode ser sistematicamente nomeada até que as propriedades da catálise sejam identificadas. Quanto ao terceiro princípio geral, adota-se que as enzimas devem ser divididas em grupos com base no tipo de reação que catalisam, em função do substrato, que é a base para a classificação individual da enzima. Isso fornece base para a classificação em números (códigos), de acordo com o Comitê Internacional de Enzimas (E. C.).

Em 1961, este Comitê sugeriu a classificação das enzimas em seis classes, usando os números (códigos) com o prefixo E. C. seguido de quatro números separados por pontos, que representam:

1. O primeiro número indica qual das seis classes a enzima pertence;
2. O segundo indica qual a subclasse;
3. O terceiro indica a sub-subclasse;
4. O quarto é específico à reação que a enzima catalisa.

As seis classes propostas são:<sup>1</sup>

- Classe 1. Oxidorredutases: esta classe compreende todas as enzimas que catalisam reações de oxirredução, ou seja, reações de transferência

---

<sup>1</sup> Mais informações sobre a classificação enzimática estão disponíveis em <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>, que propicia dados constantemente atualizados.

de elétrons. O nome recomendado é *dehidrogenase* sempre que possível, no entanto, *redutase* pode ser também utilizado. Quando o  $O_2$  é o aceptor da redução usa-se *oxidase*.

- Classe 2. Transferases: enzimas que transferem um grupo específico como metil, acil, amino, glicosil ou fosfato, de uma substância para outra.
- Classe 3. Hidrolases: enzimas que hidrolisam ligações C – C, C – O, C – N, e outras pontes incluindo fosfórico e anidrido. O nome sistemático sempre inclui *hidrolase*.
- Classe 4. Liases: enzimas que quebram ligações C – C, C – O, C – N e outras pontes, atuando em duplas ligações ou anéis. Inversamente, também adicionam grupos em duplas ligações. O nome sistemático é de acordo com o grupo substrato – *liase*.
- Classe 5. Isomerases: enzimas que catalisam mudanças geométricas ou estruturais em uma molécula. Dependendo do tipo de isomerismo podem ser chamadas de racemases, epimerases, cis-trans-isomerases, isomerases, tautomerases, mutases ou cicloisomerases.
- Classe 6. Ligases: enzimas que catalisam a união de duas moléculas, em conjunto com a ponte pirofosfato do ATP ou outro nucleosídeo. Até 1983, o nome recomendado era *shintetase*, no entanto, na recomendação atual, o nome é *X - Y ligase*, a fim de evitar confusão com o nome *shintase* que não faz parte de enzimas da classe 6. O nome sistemático é formado de acordo com *X:Y ligase*.

## Enzimas lipolíticas

As enzimas lipolíticas estão atualmente atraindo enorme atenção por causa de seu potencial biotecnológico (Trevisan, 2004), como por exemplo, na indústria alimentícia e na área dos detergentes e, recentemente, na produção de biodiesel, por meio da transesterificação de gorduras, uma alternativa do combustível petróleo para os problemas ambientais (Kourist; Brundiek; Bornscheuer, 2010).

A maioria das enzimas lipolíticas industriais é de origem microbiana, bacteriana ou fúngica. As lipases (EC 3.1.1.3) e esterases (EC 3.1.1.1) são enzimas representantes da classe 3, que hidrolisam cadeia longa ( $\geq 10$  átomos de carbono) e cadeia pequena ( $< 10$  átomos de carbono).

Nos procariotos, as enzimas lipolíticas podem ser classificadas em oito famílias diferentes, de acordo com os pesquisadores Arpigny e Jaeger (1999). Esta classificação é está baseada nas sequências conservadas, motivos e propriedades biológicas, denominadas: verdadeiras lipases, GDSL, lipase hormônio-sensitiva (HSL) e as famílias III, V-VIII.

A família I (verdadeiras lipases) é constituída de seis subfamílias, que possuem em sua maioria a presença do pentapeptídeo conservado <Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly>. As subfamílias I.1 e I.2 da família I compartilham homologia na posição de dois resíduos de aspartato e dois de cisteína, que estão envolvidos na formação do sítio de ligação ao Ca<sup>+2</sup> e pontes dissulfeto, respectivamente. Por estes resíduos estarem perto dos sítios catalíticos da histidina e aspartato, acredita-se que eles estejam envolvidos na estabilização do centro ativo das enzimas (Figura 11.1).

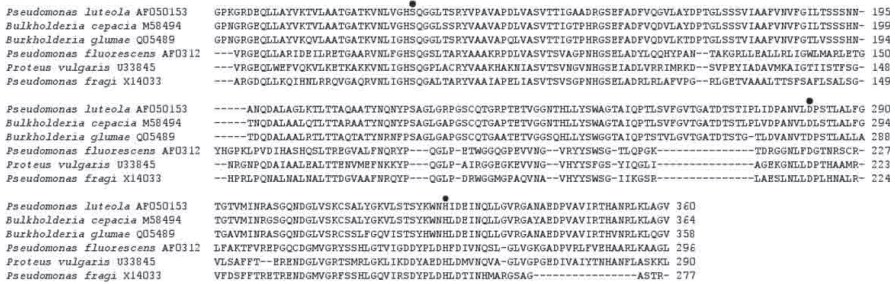


Figura 11.1 – Alinhamento de sequências de aminoácido de representantes da família I. É possível verificar nos blocos conservados os sítios catalíticos (•).

A família II apresenta o motivo <Gly-Asp-Ser-(Leu)> sendo, por isso, conhecida como família GDSL (Figura 11.2). Os membros da família III possuem o dobramento regular alfa/beta hidrolase e a típica tríade catalítica, além de exibirem 20% de identidade com sequências de aminoácidos do PAF-AH humano (Acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas).

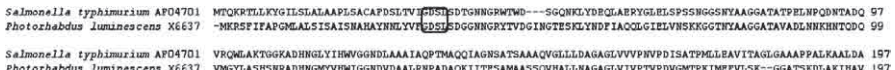


Figura 11.2 – Alinhamento de sequências de aminoácido de representantes da família II, sendo possível visualizar a presença do bloco conservado GDSL, característico desta família.

A família IV apresenta similaridade com as Lipases Hormônio-Sensitiva de mamíferos, sendo conhecidas como HSL. Nesta família, verifica-se o sítio conservado HGGG e logo após, o pentapeptídeo GDSAG localizado no N-terminal da proteína (Figura 11.3).

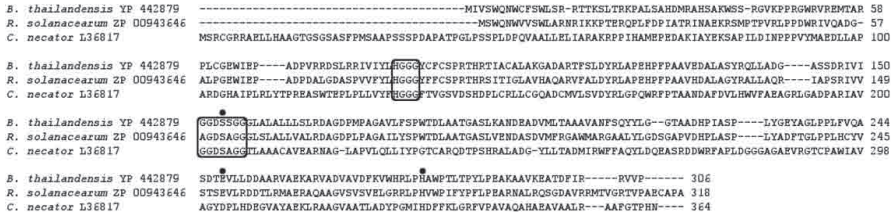


Figura 11.3 – Alinhamento de seqüências de aminoácido de representantes da família IV. Presença do bloco conservado HGGG e GDSAG; e da tríade catalítica (●).

A família V possui membros com estruturas similares à dehalogenases, haloperoxidases e epoxide hidrolases, e folha alfa/beta hidrolase como característica da estrutura terciária. Nesta família, é possível verificar os blocos conservados GXSMGG, PTLV e GH, que são característicos dos membros desta família (Figura 11.4).

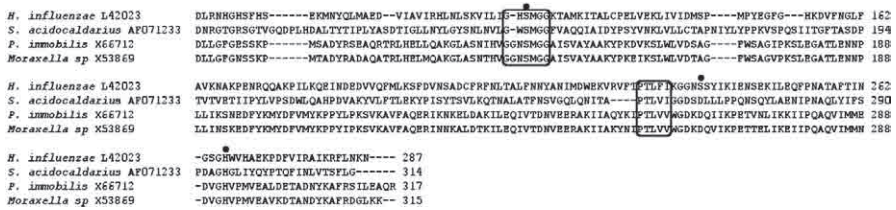


Figura 11.4 – Alinhamento de seqüências de aminoácido de representantes da família V. Presença do bloco conservado GXSMGG e PTLV; e da tríade catalítica (●).

As enzimas lipolíticas da família VI estão entre as menores esterases conhecidas, com massa molecular entre 23-26 kDa. O sítio ativo destas enzimas é um dímero, e a subunidade possui dobramento alfa/beta hidrolase e a clássica tríade catalítica <Ser-Asp-His>.

Na família VII, grande parte das enzimas bacterianas divide homologia com sequências de aminoácidos de acetilcolina esterases de eucariotos e com carboxilesterases de intestino e fígado. Já a família VIII é constituída por enzimas com 380 resíduos de aminoácidos, as quais compartilham similaridade com várias  $\beta$ -lactamases da classe C, sendo o motivo <Ser-Xaa-Xaa-Gly>. No entanto, para outros autores este motivo conservado que as caracteriza é outro, sendo necessário mais informação sobre esta família.

Embora em 1999 tenha sido proposta esta classificação abrangente (Argigny; Jaeger, 1999), novas lipases e esterases estão sendo identificadas no decorrer dos anos (Chu et al., 2008; Couto et al., 2010; Lee et al., 2004, Ranjan et al., 2005, Rhee et al., 2005, Wu; Sun, 2009). Com o advento da tecnologia do DNA recombinante e construção de complexas bibliotecas metagenômicas, diferentes amostras ambientais estão sendo estudadas e, conseqüentemente, novas enzimas lipolíticas foram identificadas, como por exemplo: a LipEH166 (Kim et al., 2009) e EstY (Wu; Sun, 2009). Segundo pesquisadores da área, a busca incessante por lipases e esterases em diferentes ecossistemas irá aumentar a diversidade das enzimas lipolíticas e, provavelmente, o número de famílias (Ranjan et al., 2005).

## Tipos de reação catalisada pelas lipases

Como mencionado anteriormente, as lipases (E. C. 3.1.1.3), denominadas lipases verdadeiras, estão dentro da classe 3 da classificação enzimática e catalisam a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol para liberar diacilglicerol, monoacilglicerol, ácidos orgânicos e glicerol (Carvalho et al., 2003). Elas possuem uma capacidade peculiar de atuar apenas na interface óleo/água, o que exclui as enzimas que agem em ésteres solúveis em água (esterases) ou que hidrolisam outros lipídeos (acilidrolases, colesterolsterases, tioesterases e outras).

A partir do estudo destas enzimas, foi comprovado que elas podem reverter a hidrólise do triacilglicerol no sentido da reação de esterificação, por meio da quantidade de água presente, portanto, a reação reversa (síntese) também pode ocorrer quando há baixa concentração de água. Este conhecimento tornou possível o uso da lipase como biocatalisador da interesterificação de óleos e gorduras, como consequência, sua aplicação na produção de biodiesel.

A reação de interesterificação traz alterações na composição e distribuição dos ácidos graxos da molécula de triacilglicerol e está relacionada com a troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e um álcool (alcoólise), ou de um éster e outro éster, na forma de glicerídeos ou de monoéster, reação esta denominada de transesterificação por alguns autores.

Dentro deste contexto, as diferentes reações desempenhadas pelas lipases são: hidrólise, esterificação e interesterificação (acidólise, alcoólise e glicerólise) (Figura 11.5).

#### Reação de Hidrólise



#### Reação de Esterificação



#### Reação de Interesterificação

##### Acidólise



##### Alcoólise



##### Transesterificação



Figura 11.5 – Esquema representando as reações catalisadas por lipases: hidrólise, esterificação e interesterificação.



## Biodiesel

Estima-se que os recursos fósseis não renováveis usados como fonte de energia serão suficientes apenas por um curto período de tempo. Além disso, emissões maciças dos gases responsáveis pelo efeito estufa por causa da utilização desses combustíveis causam mudanças irreversíveis no clima global. Dessa forma, faz-se necessário solucionar a dependência ao petróleo bruto e estabelecer uma alternativa, que pode ser baseada em energias renováveis e matérias-primas abundantes, como a biomassa de vegetais (Röttig et al., 2010). O mercado de biocombustíveis é representado pelo bioetanol e biodiesel, utilizados para substituir os combustíveis de primeira geração, gasolina e diesel, em larga escala.

A desvantagem associada à produção do biodiesel está ligada a seu preço final e a problemas éticos, como concorrência com a produção mundial de alimentos. Porém, existe uma compensação quando se utilizam matérias-primas de menor valor ou resíduos, como óleo de cozinha que seria descartado. O biodiesel é considerado extremamente competitivo em relação ao combustível derivado do petróleo, pois além de ter qualidade similar possui características vantajosas, como a dependência de fontes renováveis, muitas vezes domésticas, ser biodegradável e emitir baixa concentração de poluentes (Knothe; Krahl; Gerpen, 2005).

Gorduras animais, óleos descartados e resíduos de gordura são alternativas de substratos frente aos óleos vegetais. No entanto, por conta do alto grau de saturação que os ácidos graxos de animais possuem, seus ésteres não são recomendados para o uso em baixas temperaturas. Produtos de descarte contêm um alto índice de ácidos graxos livres, precisando de um pré-tratamento para posterior aproveitamento. Outra possibilidade é a utilização de ácidos graxos formados como subprodutos da produção de celulose (*tall oil*). A produção de uma tonelada de celulose resulta em 30 kg a 40 kg desse óleo, que contém uma mistura de ácidos graxos (42%-55%), resina (33%-47%), esteróis e outros componentes. Este óleo é considerado um dos óleos mais baratos do mercado.

A substituição dos combustíveis fósseis deve atender alguns requisitos para que esta ação seja vantajosa e, em muitos aspectos, o biodiesel tem se mostrado um excelente combustível de segunda geração. Ele é menos tóxico e mais facilmente degradado (Röttig et al., 2010). A composição do diesel é quimicamente mais complexa e sua biodegradação requer mais

energia. Finalmente, alguns compostos do diesel comum são tóxicos para os microrganismos, o que contribui para uma menor biodegradabilidade.

Óleos vegetais e gordura animal despertaram interesse a partir de 1970, por causa da crise de energia que ocorreu nessa década, sendo investigados como fontes possíveis de combustíveis alternativos por Rudolf Diesel (1858-1913). Como estes compostos apresentam elevada viscosidade em comparação aos combustíveis derivados de petróleo, o que acarreta problemas aos motores automotivos, quatro soluções foram encontradas para resolver o problema: microemulsificação, pirólise, diluição com combustíveis convencionais derivados de petróleo e transesterificação (Knothe; Krahl; Gerpen, 2005). A última é a metodologia utilizada para a produção de biodiesel.

## Reação de transesterificação

O biodiesel é formado pela reação de transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal, que possuem em sua composição principalmente triacilgliceróis, também denominados triglicerídeos. Nessa reação, os triacilgliceróis reagem com álcool na presença de um catalisador, formando alquil ésteres (biodiesel) e glicerol (Figura 11.6). A constituição do produto corresponde ao tipo de triacilglicerol utilizado na reação, mas os componentes mais comuns são ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) em diferentes proporções (Röttig et al., 2010).

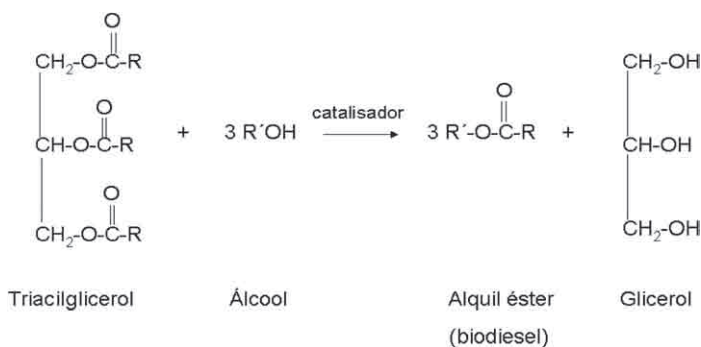


Figura 11.6 – Esquema da reação de transesterificação. R é uma mistura de várias cadeias de ácidos graxos.

Fonte: Knothe; Gerpen; Krahl, 2004.

Os produtos mais comuns são os metil ésteres, visto que o metanol é o álcool com menor custo em diversos países. No Brasil, no entanto, o etanol é utilizado mais frequentemente, por ser o álcool menos oneroso em sua produção em função da fermentação da cana-de-açúcar, resultando em etil ésteres. Estes, por sua vez, possuem numerosas vantagens em comparação aos metil ésteres, desde sua eficiência até sua taxa reduzida de emissão de poluentes. Porém, o desempenho máximo de ambos é menor em comparação com o combustível de origem fóssil (Knothe; Krahl; Gerpen, 2005).

A reação de transesterificação ocorre por catálise ácida ou básica. Comumente, a forma básica é a mais utilizada por ser um processo mais rápido de catálise, é menos corrosiva e tem uma taxa de eficiência 4 mil vezes maior. Porém, a principal dificuldade relacionada à catálise básica é a saponificação que ocorre quando estão presentes água e ácidos graxos livres na amostra (Röttig et al., 2010). Para que a reação ocorra resultando em máxima produção, o álcool precisa ser puro, e o óleo utilizado deve conter uma porcentagem menor que 0,5% de ácidos graxos livres.

O rendimento final da formação de etil ésteres não é influenciado pelo tipo de álcool, mas álcoois de cadeias mais longas são mais solúveis em óleo e permitem que sejam utilizadas altas temperaturas, acelerando a velocidade de reação. O mesmo não ocorre com relação à proporção entre álcool e óleo. Para deslocar o equilíbrio no sentido da formação do produto, a relação molar ideal é de 3:1 para catálise básica e até 30:1 na catálise ácida. Parâmetros de temperatura foram estabelecidos, sendo 60°C, em uma proporção de 6:1 de álcool: óleo, para o metanol, 75°C para o etanol e 114°C para o butanol, nesta mesma proporção (Knothe; Krahl; Gerpen, 2005).

Na reação de transesterificação, alcóxidos em solução com o álcool correspondente impedem que ocorra a formação de água e resultam na formação de glicerol com maior pureza. Em princípio, a reação de transesterificação é reversível, porém, para a produção de biodiesel, o mesmo não ocorre, pois o glicerol formado não é miscível com o produto, resultando em um sistema de duas fases.

Nessa reação, ocorre a formação de di e monoacilgliceróis como produtos intermediários, que podem variar de acordo com as condições aplicadas. A formação de glicerol a partir de triacilgliceróis ocorre por etapas através de di e monoacilgliceróis, com uma molécula de alquil éster sendo formada em cada passo. Sabe-se que diacilgliceróis atingem máxima concentração

antes dos monoacilgliceróis, então, no último passo, a formação do glicerol a partir deste ocorre mais rapidamente em relação a sua formação por diacilgliceróis. A adição de solventes pode acelerar a reação, já que supera a limitação envolvendo a miscibilidade do álcool com o óleo ou gordura utilizada. Outras alternativas para acelerar o processo envolvem a utilização de micro-ondas ou irradiação ultrassônica (Knothe; Krahl; Gerpen, 2005).

Os processos químicos descritos acima englobam a base da produção industrial de biodiesel, que está intimamente relacionada com sua qualidade. As etapas realizadas para refinar a matéria-prima utilizada determinam se o combustível atingirá as especificações para sua aplicação industrial.

Embora catalisadores químicos sejam relativamente baratos e ofereçam elevada taxa de reação, estes compostos apresentam inconvenientes, como consumo de energia, necessidade de neutralização do catalisador e várias etapas de purificação final por causa da complicada remoção do catalisador e do glicerol. Além disso, a catálise alcalina industrial exige alta qualidade de reagentes, matérias-primas ausentes de água e ácidos graxos livres (Bisen et al., 2010). Entretanto, outra forma viável de produção de biodiesel é realizada pela catálise enzimática, que possui vantagens em relação ao método químico, visto que é menos prejudicial ao ambiente e resulta em um produto com elevada pureza.

Tabela 11.1 – Propriedade dos álcoois contendo de 1 a 4 carbonos.

	Fórmula	Peso molecular	Temperatura de ebulição (°C)	Temperatura de fusão (°C)
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	32,042	65	-93,9
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	46,069	78,5	-117,3
1-Propanol	CH <sub>2</sub> OH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	60,096	97,4	-126,5
2-Propanol (iso-Propanol)	CH <sub>3</sub> -CHOH-CH <sub>3</sub>	60,096	82,4	-89,5
1-Butanol (n-Butanol)	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	74,123	117,2	-89,5
2-Butanol	CH <sub>3</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	74,123	99,5	-
2-Metil-1-Propanol (iso-butanol)	CH <sub>2</sub> OH-CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>   CH <sub>3</sub>	74,123	108	-
2-Metil-2-propanol	CH <sub>3</sub> -CHOH-CH <sub>3</sub>   CH <sub>3</sub>	74,123	82,3	25,5

## Transesterificação por enzimas

A transesterificação realizada por enzimas permite o uso de óleos e gorduras com menor qualidade, isto é, contendo ácidos graxos livres (o que facilita a separação do produto), utiliza condições moderadas de reação; não necessita de grande quantidade de álcool, levando a um menor gasto de energia e custos de produção reduzidos. Atualmente, este processo é quase exclusivamente feito em escala laboratorial e suas principais desvantagens são o elevado custo das enzimas e sua possível inativação por álcoois de cadeia curta, como metanol, ou outros componentes do óleo (Bisen et al., 2010).

A produção de biodiesel pela catálise enzimática depende, do mesmo modo que a catálise química, de fatores como temperatura, relação taxa de álcool: óleo e teor de água na reação. No entanto, neste caso, outros fatores influenciam o processo de reação, como o tipo de álcool, o uso de solventes e as propriedades das enzimas utilizadas (Röttig et al., 2010). Essa reação é realizada pelas lipases, anteriormente descritas neste capítulo.

Para a produção deste combustível, podem ser utilizadas tanto lipases em sua forma livre como imobilizadas. Embora os custos do processo de preparo das lipases livres sejam reduzidos, o custo da produção do biodiesel aumenta, pois as enzimas não podem ser reutilizadas. Além disso, elas exigem longo tempo de reação para atingir rendimentos elevados. Por outro lado, a imobilização das enzimas tem um efeito estabilizador sobre ela, e permite a aplicação no sistema de elevadas temperaturas, que levam a uma taxa de conversão mais rápida e com menor tempo de reação (Bisen et al., 2010).

Entre as vantagens do uso de lipases na produção de biodiesel (ibidem) estão:

- possibilidade de regeneração e reutilização dos resíduos imobilizados, já que eles podem ser mantidos no reator sem sofrer alterações;
- utilização de enzimas em reatores, o que permite seu uso em alta concentração e contribui para uma ativação das lipases por maior período de tempo;
- maior estabilidade térmica da enzima, por estar em seu estado nativo;
- a imobilização de lipases as protege do solvente que pode ser necessário para a reação;
- a separação do produto é facilitada ao utilizar este biocatalisador.

As lipases mais frequentemente utilizadas são isoladas de microrganismos do gênero *Candida*, como *C. rugosa* e *C. antarctica*. Diferentemente da catálise química, que geralmente ocorre em temperaturas ligeiramente abaixo do ponto de ebulição do álcool ( $> 60^{\circ}\text{C}$ ), a temperatura ideal para a catálise enzimática depende da lipase utilizada, mas é, geralmente, entre  $30^{\circ}\text{C}$  e  $45^{\circ}\text{C}$  (Röttig et al., 2010).

Quase todos os tipos de álcool podem ser usados, embora álcoois de cadeia curta, como o metanol (Tabela 11.1) possam inativar a lipase. Esta inativação é atribuída à baixa solubilidade dos álcoois de cadeia curta no óleo ou gordura. Dessa forma, o metanol é menos adequado do que o etanol também para a catálise enzimática (Bisen et al., 2010, Röttig et al., 2010). Embora a produção com álcoois de cadeia longas seja geralmente maior, o rendimento de alquil ésteres depende da especificidade do substrato da lipase utilizada. Algumas lipases também são capazes de agir com presença de até 20% de água.

Além das enzimas em sua forma purificada ou imobilizada, pode ser aplicada toda a célula atuando como biocatalisador, o que reduz significativamente os custos, uma vez que não são necessários isolamento, purificação e imobilização da lipase. Esse tipo de imobilização de toda a célula não só permite seu uso por repetidas vezes, mas também aumenta a atividade específica da lipase intracelular de quatro a sete vezes (Bisen et al., 2010).

Técnicas de Engenharia Genética, envolvendo a produção de proteínas podem ser úteis para melhorar a eficiência catalítica de lipases. O uso da tecnologia do DNA recombinante para produzir grandes quantidades de lipases e a utilização das enzimas ou células imobilizadas são uma abordagem para estimular a produção de biodiesel. Além disso, a transesterificação enzimática é considerada melhor para o ambiente, e precisa ser explorada para a produção industrial deste biocombustível.

Apesar de inúmeras lipases serem usadas atualmente, muitas vezes os biocatalisadores precisam ser mais bem estudados para mostrar a especificidade desejada, estabilidade, propriedades operacionais, entre outras características. A criação de enzimas consideradas personalizadas para uma reação de interesse, métodos clássicos, como variação de solventes e metodologias de imobilização são complementados com o uso de métodos da engenharia de proteínas (Kourist; Brundiek; Bornscheuer, 2010). Adicionalmente, o isolamento eficaz de novas lipases obtidas pela abordagem

metagenômica pode ser um caminho para a obtenção de enzimas mais eficientes na produção do biodiesel.

## Metagenoma e lipases

A metagenômica é uma abordagem recente e que tem possibilitado a descoberta de uma infinidade de novas enzimas, como por exemplo, as diversas enzimas lipolíticas que puderam ser isoladas de diferentes fontes, como a água de lagoas, sedimento marinho, microflora do rúmen de bovinos, do solo, entre outros.

Elend e colaboradores (2006) isolaram, entre várias esterases, uma lipase ativa em baixas temperaturas oriunda de uma biblioteca metagenômica de solo contaminado com óleo. A lipase foi purificada e teve alta similaridade com lipase de *Pseudomonas fluorescens*. Outra lipase ativa em baixas temperaturas foi isolada de uma amostra de sedimento marinho por Jeon e colaboradores (2009). A enzima encontrada possuiu similaridade muito baixa com proteínas caracterizadas até a data, com exceção de uma lipase de um microrganismo não cultivado.

Dentro deste contexto, no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, da Unesp de Jaboticabal, foram prospectados genes para a codificação de enzimas lipolíticas em 4,5 mil clones de uma biblioteca metagenômica fosmidial construída a partir de DNA de um consórcio microbiano degradador de óleo diesel. A seleção foi feita pela atividade lipolítica por meio do cultivo dos clones em placa de petri, contendo o meio Luria-Bertani (LB) suplementado de 1% de tributirina (v/v), 1% de goma arábica (p/v), 0,00125% de cloranfenicol (v/v) e 0,001% arabinose (v/v). As células ficaram em cultivo a 37°C por 48 horas e depois foram transferidas a 4°C. A avaliação foi realizada pela observação de um de halo ao redor da colônia, sendo positiva para 30 clones dentre os quais três se destacaram (Figura 11.7). Estes três clones que apresentaram halos maiores foram selecionados, e tiveram seu DNA subclonado em vetor pUC19.

Os DNAs das sub-bibliotecas foram sequenciados no ABI 3100 (Applied Biosystems), gerando um *contig* completo para cada clone, que foram comparados com as sequências do *genbank* hospedadas no banco National Center for Biotechnology Information (NCBI), por meio do programa ORF Finder. Uma ORF de 322 aminoácidos com 76% de identidade para

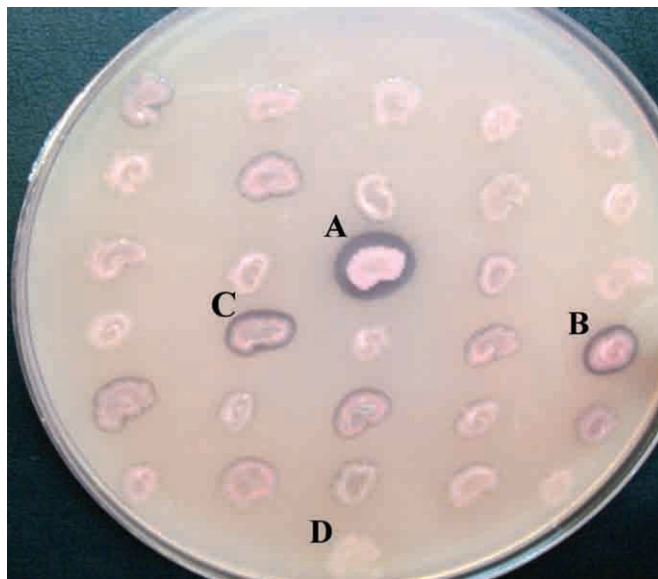


Figura 11.7 – Análise *in vitro* em placa de petri dos 30 clones da biblioteca metagenômica, previamente selecionados, em meio LB suplementado com 1% de tributirina (v/v); 1% de goma arábica (p/v); 0,001% de arabinose (v/v); 0,00125% de cloranfenicol (v/v); e 0,001% de Rhodamine-B (v/v). A – Clone PL17.E10; B – Clone PL32.D09; C – Clone PL28.H10; D – Controle negativo.

Fonte: Pereira, 2011 (modificado).

uma possível esterase/lipase foi identificada em um dos *contigs* analisados. Por outro lado, quatro *ORFs* relacionadas a esterase/lipase puderam ser identificadas no segundo clone analisado, dentre as quais uma alcançou 58% de identidade com uma possível esterase/lipase de bactéria não cultivável. No terceiro *contig*, foi encontrada outra *ORF* codificadora de esterase/lipase de 303 aminoácidos e 61% de identidade com microrganismo não cultivável. Foram feitos alinhamentos com o programa Clustal W e construção de árvores filogenéticas pelo MEGA 4.0.2, método de *neighbor-joining* com mil *bootstrap*, para comparação entre as *ORFs* encontradas e sequências depositadas. As árvores indicam que o primeiro clone apresenta a *ORF* similar à família IV das enzimas lipolíticas; o segundo possui três *ORFs* pertencentes à família V e uma à família IV; e o terceiro apresenta uma *ORF* similar à família IV; no entanto, esta *ORF* está localizada em um ramo único, diferenciando-se dos outros representantes desta família.



Através dos alinhamentos, foi possível identificar os sítios ativos representativos de cada família, confirmando o resultado das árvores filogenéticas.

Quando a mesma análise foi realizada com sequências já patenteadas, algumas *ORFs* mostraram baixa similaridade com sequências pertencentes à Bayer Chemicals, Monsanto e BASF, fato este concordante com a análise do dendrograma, no qual é possível verificar o isolamento em ramos das *ORFs* identificadas neste estudo (Figura 11.8).

Tais descobertas enfatizam que a abordagem metagenômica oferece acesso às enzimas que, dificilmente, estariam disponíveis por meio das técnicas tradicionais de cultivo, tornando possível a busca e compreensão de novas enzimas assim como o estudo da diversidade genética de microrganismos em determinado ambiente.

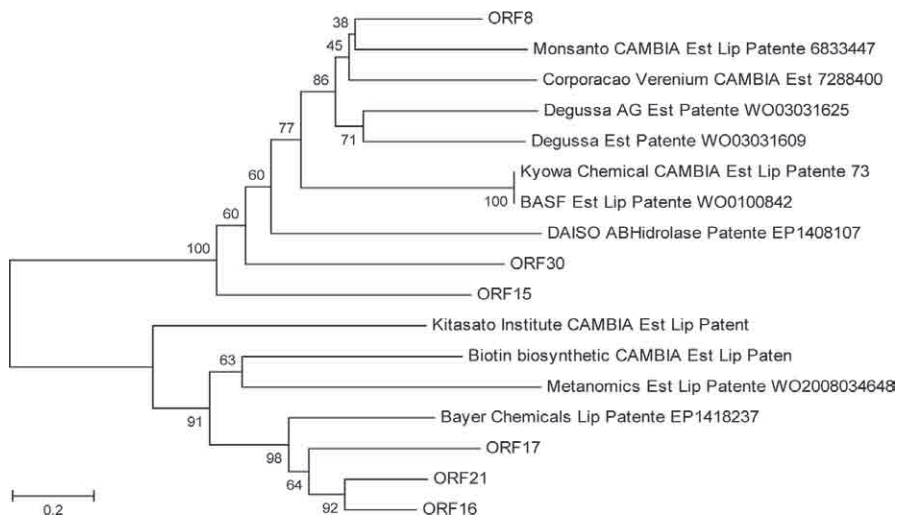


Figura 11.8 – Dendrograma do agrupamento hierárquico baseado nas 11 sequências patenteadas e extraídas do NCBI, com as *ORFs* encontradas nos clones P17.E10 e P132.D09. Construção da árvore filogenética pelo MEGA 4.0.2, método *neighbor-joining* com mil *bootstrap*.

Fonte: Maester, 2011; Pereira, 2011 (modificado).

## Biodiesel no Brasil

Em 2008, a produção global de biodiesel foi de 12,2 milhões de toneladas, sendo 7,7 milhões produzidos na Europa, dos quais 2,8 milhões somen-

te na Alemanha. No Brasil, a entrada do biodiesel no mercado nacional vai gerar uma expressiva economia reduzindo as importações do diesel de petróleo, além de contribuir para a preservação do meio ambiente. Esse combustível substitui total ou parcialmente o diesel de petróleo em motores de caminhões, tratores e automóveis e também pode ser utilizado para geração de energia e calor. Pode ser usado puro ou misturado ao diesel em diversas proporções. A mistura de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo é chamada de B2 e assim sucessivamente, até o biodiesel puro, denominado B100.

De acordo com Governo Federal, o Brasil importa, atualmente, 10% do diesel que consome. Este, por seu uso em transportes de cargas e passageiros, é o combustível mais utilizado no país (57,7% dos combustíveis líquidos), o que representa um consumo anual de 38,2 bilhões de litros. Segundo dados da ANP (Agência Nacional de Petróleo), aproximadamente 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos no Brasil já são renováveis e, no restante do mundo, 86% da energia vêm de fontes energéticas não renováveis. Desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), que aumentou de 4% para 5% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel.

O Brasil reúne condições ideais para tornar-se um grande produtor mundial de biodiesel, pois dispõe de extensas áreas agricultáveis, parte delas não propícias ao cultivo de gêneros alimentícios, mas com solo e clima favoráveis ao plantio de inúmeras oleaginosas. Pode ser produzido a partir de gorduras animais ou de óleos vegetais, existindo dezenas de espécies vegetais no país que podem ser utilizadas, tais como mamona, dendê (palma), girassol, babaçu, amendoim, pinhão manso, soja, dentre outras. Dessa forma, estudar as formas de obtenção do biodiesel, envolvendo aspectos éticos e favoráveis para o meio ambiente contribuirá com a economia e desenvolvimento do país.

## Perspectivas

Muitos desafios precisam ser transpostos na tecnologia atual de produção de biodiesel e estes incluem o desenvolvimento de catalisadores melho-

res e mais baratos, resultando em produtos de alta qualidade, utilização de solventes não fósseis e a conversão dos subprodutos, como o glicerol, em produtos úteis.

O custo de produção do biodiesel pela catálise enzimática é o principal obstáculo para a comercialização deste produto. Várias tentativas têm sido feitas para desenvolver sistemas de baixo custo usando as ferramentas da tecnologia do DNA recombinante. É possível aumentar a eficiência das lipases por meio da caracterização enzimática e Engenharia de Proteínas (Kourist; Brundiek; Bornscheuer, 2010).

Resultados obtidos pelo grupo do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, da Unesp de Jaboticabal, são promissores nesta busca por novos biocatalisadores. Após a caracterização das *ORFs* encontradas será possível inferir se resultarão em enzimas lipolíticas com elevada especificidade com o substrato, se possuem estereoespecificidade e termoestabilidade suficientes para beneficiar a produção de biodiesel e reduzir os custos de todo o processo.

## Referências bibliográficas

- AEHLE, W. *Enzymes in Industry: production and applications*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004. 484p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 11 jun. 2011.
- ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, v.343, p.177-83, 1999.
- BISEN, P. S. et al. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. *Biotechnology Letters*. v.32, p.1019–30, 2010.
- CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrações de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, v.26, n.1, 2003.
- CHU, X. et al. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from south China sea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.80, p.615-25, 2008.
- COUTO, G. H. et al. Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazil coast. *Genetics and Molecular Research*, v.9, n.1, p.514-23, 2010.
- ELEND, C. et al. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.5, p.3637-45, 2006.

- FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. *Microbial enzymes and biotechnology*. 2 .d. New York: Elsevier Applied Science, 1990. 472 p.
- JEON, J. H. et al. Cloning and characterization of a new cold-active lipase from a deep-sea sediment metagenome. *Applied and Microbiology Biotechnology*. v.81, p.865-74, 2009.
- KIM, E. Y. et al. Novel cold-adapted alkaline lipase from an intertidal flat metagenome and proposal for a new family of bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, v.75, n.1, p.257-60, 2009.
- KNOTHE, G.; KRAHL, J.; GERPEN, J. V. *The biodiesel handbook*. Illinois: AOCS Press, 2005. 302p.
- KOURIST, R.; BRUNDIEK, H.; BORNSCHEUER, U. T. Protein engineering and discovery of lipases. *European Journal of Lipid Science Technology*. v.112, p.64-74, 2010.
- LEE, S. W. et al. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.65, p.720-6, 2004.
- MAESTER, T. C. *Prospecção de sequências genômicas codificadoras de enzimas lipolíticas degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo*. São Paulo, 2011. 82f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP).
- NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (NC-IUBMB). Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 11 jun. 2011.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Química Nova*, v.29, n.1, 2006.
- PEREIRA, M. R. *Prospecção de genes codificadores de enzimas lipolíticas em biblioteca metagenômica de consórcio microbiano degradador de óleo diesel*. São Paulo, 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP).
- PROGRAMA NACIONAL DE PRODUÇÃO E USO DE BIODIESEL. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br>>. Acesso em: 11 jun. 2011.
- RANJAN, R. et al. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, n.335, p.57-65, 2005.
- RHEE, J. K. et al. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.2, p.817-25, 2005.
- RÖTTIG, A. et al. Fatty acid alkyl esters: perspectives for production of alternative biofuels. *Applied and Microbiology Biotechnology*, v.85, p.1713-33, 2010.
- TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.
- WU, C.; SUN, B. Identification of novel esterase from metagenomic library of Yangtze River. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.19, n.2, p.187-93, 2009.



## **Estressores bióticos em cana-de-açúcar: reflexos quali-quantitativos na matéria-prima e no processamento industrial**

*Márcia Justino Rossini Mutton, Miguel Angelo Mutton,  
Leonardo Lucas Madaleno, José Antonio de Souza Rossato Júnior,  
Eduardo Rossini Guimarães, Gisele Cristina Ravanelli,  
Maria Inês Tiraboschi Ferro, Odair Aparecido Fernandes*

### **Introdução**

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta  $C_4$  e apresenta uma das maiores eficiências fotossintéticas encontradas em culturas agrícolas (Cock, 2003) e potencial geneticamente favorável para acúmulo de açúcares na forma de sacarose (Mutton, 2008). Quanto à habilidade para transformar e fixar energia, verifica-se que, para a cana-de-açúcar, a relação entre a energia consumida e a energia produzida é da ordem de 1:8, enquanto para a cultura do milho a relação é de 1:1,4 e para a beterraba é de 1:2,5.

Encontra-se amplamente distribuída entre os países tropicais e subtropicais, ocupando 1% de área entre as 18 culturas mais cultivadas (Leff et al., 2004). Os países que cultivam a cana-de-açúcar produziram 1,66 bilhão de toneladas de colmos e o Brasil participou com 40,4% deste total numa área de 8.514.370 ha no ano de 2009 (Faostat, 2011).

A cana-de-açúcar ocupa atualmente 8,4 milhões de hectares ou aproximadamente 2% da terra agricultável do Brasil (394 milhões de ha). O país apresenta a região Centro-Sul como principal produtora de matéria-prima para a indústria sucroenergética, sendo que a produção do estado de São Paulo representa 61% da produção nacional (Unica, 2011). Em média, a produtividade anual brasileira está entre 70 a 80 t/ha, enquanto que, para o estado

de São Paulo, principal produtor (21% da produção mundial), os valores são de 80 t/ha a 85 t/ha (Conab, 2011).

A cana-de-açúcar vem passando, nos últimos anos, por mudanças profundas de âmbito tecnológico e social, para adaptar-se às demandas de produção com alta produtividade, competitividade, respeito ao meio ambiente e sustentabilidade. O aumento da área colhida mecanicamente e a restrição à queima da cana-de-açúcar têm ocasionado mudanças significativas no manejo dessa cultura (Almeida et al., 2004).

Esta mudança no sistema de produção ocorreu especialmente por causa do aspecto da preservação do meio ambiente para atender à legislação ambiental. Além disso, há outras vantagens do sistema de colheita denominado cana crua, tais como: proteção do solo contra erosão, redução dos custos com os tratos culturais (menor incidência de plantas daninhas), maior longevidade da cultura e ainda a possibilidade de aproveitamento energético da palha (Souza et al., 2005).

No sistema de colheita mecânica da cana-de-açúcar, a quantidade de palha que deixa de ser queimada e é depositada sobre o solo pode variar de 10 a 20 t/ha de massa seca, em função da variedade, estágio fenológico e da produtividade agrícola. Essa mudança no manejo da colheita teve reflexos imediatos nas características do agroecossistema da cana-de-açúcar, resultando em alterações no perfil da entomofauna, principalmente no que se refere à composição das diferentes espécies de pragas e respectivas densidades populacionais (Garcia; Sverzut Júnior, 2008). Além deste aspecto, a expansão da cultura para novas áreas e a não utilização de cuidados fitossanitários adequados na implementação e nos tratos culturais proporcionaram condições para a expansão da área de ocorrência e de danos de algumas pragas.

## **Estressores bióticos e fisiologia da planta**

O conceito de estresse como fenômeno é surpreendentemente recente. Originalmente, o termo estresse foi associado ao conceito mecânico em que uma força é aplicada a um corpo. A seguir, o conceito de estresse foi aplicado aos seres humanos e definido como resposta a várias condições físicas e fisiológicas (Seyle, 1973). Neste mesmo contexto, o estresse de uma planta

está envolvido por uma reação adversa aos fatores do ambiente, podendo ser biótico e/ou abiótico (Higley et al., 1993).

A produtividade da cana-de-açúcar é regulada por diversos fatores de produção, dentre os quais se destacam: o potencial genético da variedade, o ambiente de produção (solo e clima), as práticas culturais adotadas, a qualidade da colheita, incluindo a qualidade da matéria-prima e o controle fitossanitário de patógenos, plantas invasoras e insetos-pragas. Vários insetos-pragas podem estar presentes no sistema de produção de cana-de-açúcar, atacando o sistema radicular ou a parte aérea da planta. Dentre estes, destacam-se três importantes estressores bióticos: a broca-do-colmo, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) e o bicudo-da-cana, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae).

A broca-do-colmo e a cigarrinha-das-raízes estão presentes em todas as regiões de produção de cana-de-açúcar do país. A primeira é uma praga que ataca as plantas de cana-de-açúcar durante todo o desenvolvimento da cultura em qualquer época do ano e pode apresentar quatro a cinco gerações por ano. O adulto é uma mariposa com as asas anteriores de coloração amarelo-palha. As posturas se assemelham a escamas de peixe e são realizadas geralmente na face adaxial das folhas da cana-de-açúcar ou em outras plantas hospedeiras. A longevidade dos adultos é de dois a nove dias. Neste período, a fêmea pode ovipositar de 300 a 600 ovos, os quais invariavelmente, estão agrupados em massas imbricadas contendo de 5 a 50 ovos cada uma. A duração do período embrionário é de 4 a 12 dias. De coloração branco-amarelada e cabeça marrom-escura, a lagarta pode atingir até 2,5cm de comprimento e a fase larval tem duração entre 20 e 79 dias. Este inseto, na forma jovem, é responsável pelo estresse às plantas, uma vez que as larvas de primeiro instar iniciam a alimentação no parênquima das folhas. No segundo ou terceiro instar realizam injúria na planta por meio da construção de galerias ascendentes no interior dos colmos (Figura 12.1).

O ataque da broca-do-colmo pode causar a morte da gema apical e consequente secamento de folhas novas (sintoma conhecido como “coração-morto”), enraizamento aéreo, brotação das gemas laterais, encurtamento dos entrenós e perda de peso. As galerias construídas pela praga também podem ser colonizadas por microrganismos oportunistas (*Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*) que podem potencializar os prejuízos





Figura 12.1 – A broca-do-colmo, *Diatraea saccharalis*, um importante estressor biótico, abrindo orifício de entrada no colmo para, posteriormente, perfurar galeria em cana-de-açúcar.

causados, caracterizando o chamado complexo broca-podridão. Estes microrganismos causam a inversão da sacarose armazenada na planta. Esse processo afeta consideravelmente a qualidade da matéria-prima e dos produtos obtidos, uma vez que interfere na cristalização do açúcar, promovendo a contaminação do caldo e causando perdas da eficiência industrial (Gagliumi, 1973; Parra, 1993).

Outro estressor biótico extremamente relevante nos sistemas de produção de cana-de-açúcar é a cigarrinha-das-raízes (*M. fimbriolata*). Trata-se

de inseto sugador, que, até a década de 1990, se mostrava de importância econômica restrita apenas a algumas regiões do Nordeste brasileiro, sendo praga secundária no Centro-Sul do Brasil (Mendonça et al., 1996). Entretanto, com o início da mudança do sistema de colheita da cana-de-açúcar sem a utilização prévia de fogo para queima da palha (cana crua), a infestação desta praga atingiu grande importância. A prática de colheita da cana crua passou a deixar sobre o solo uma cobertura vegetal abundante, que favorece a manutenção de alta umidade e menor oscilação de temperatura, que são extremamente favoráveis ao desenvolvimento da praga (ibidem; Dinardo-Miranda et al., 2001a). Somado a isso, o controle físico com o uso do fogo que indiretamente destruía todos os estágios de desenvolvimento da praga, especialmente os ovos em diapausa, passaram a não mais ocorrer e, com isso, houve favorecimento do potencial biótico dessa praga.

Com potencial para injuriar as plantas de cana-de-açúcar em qualquer estágio fenológico, a cigarrinha-das-raízes tem seu período de infestação restrito à estação chuvosa, haja vista a dependência do inseto por níveis elevados de umidade e temperatura. As fêmeas do inseto realizam postura no solo, na região do colo da planta, nas proximidades dos perfilhos, em número médio de 50 a 80 ovos. O desenvolvimento embrionário do inseto ocorre em torno de 21 dias em condições de temperatura favorável e alta umidade no solo (Mendonça et al., 1996). Desde a eclosão, as ninfas, que passam por cinco ecdises, permanecem durante todo o período de desenvolvimento alimentando-se no sistema radicular do hospedeiro (Stingel, 2005). As ninfas produzem espuma característica (Figura 12.2) formada de líquidos eliminados pelo ânus que são formados pelo volume de seiva sugado e de substância mucilaginosa excretada pelas glândulas epidérmicas do sétimo e oitavo segmentos abdominais, denominadas glândulas de Batelli.

A espuma protege a forma jovem do inseto contra dessecação (Garcia, 2002) e inimigos naturais (Macedo et al., 1997). Ao alimentarem-se, ocasionam desordem fisiológica na planta em decorrência do ato de sugar, atingindo os vasos lenhosos da raiz, deteriorando-os e impedindo ou dificultando o fluxo de água e nutrientes. Isso constitui a fase mais prejudicial da praga, e a necrose das raízes permite a entrada de fungos patogênicos na planta (Macedo, 2005).



Figura 12.2 – Ninfas da cigarrinha-das-raízes encontradas na base da planta e sempre envolvidas por espuma. No detalhe, a forma adulta do inseto.

Os adultos apresentam longevidade de aproximadamente 20 dias (Garcia; Sverzut Junior, 2008) e vivem sobre a parte aérea da planta sugando as folhas ao mesmo tempo que injetam toxinas que produzem manchas longitudinais. Esses adultos medem aproximadamente 12 mm de comprimento e 5 mm a 6,5 mm de largura (Macedo, 2005; Stingel, 2005).

A magnitude dos danos provocados pelo ataque de cigarrinhas-das-raízes varia com diversos fatores, entre os quais a época de colheita da cultura e a variedade cultivada (Dinardo-Miranda, 2008). Os danos provocados pela praga sobre o crescimento da cana-de-açúcar podem ser observados quando se verifica o aparecimento da praga e a cultura se encontra desenvolvida

e quando o canavial ainda está em início de crescimento e será colhido no meio e final de safra (Dinardo-Miranda et al., 1999).

O ataque de ninfas e adultos de *M. fimbriolata* resulta em colmos menores e mais finos (Dinardo-Miranda et al., 2000a), que leva a redução do teor de sacarose (Mendonça et al., 1996). Segundo Dinardo-Miranda et al. (2006a), redução de 25% na produtividade foi observada para a variedade SP80-1842 quando a praga não foi controlada. Além da redução da produtividade de colmos, quando em elevadas populações, a planta atacada apresenta menores teores de Brix e Pol do caldo e aumento do teor de fibra dos colmos (Gonçalves et al., 2003).

O outro inseto em importância para a cultura da cana-de-açúcar, o bicudo-da-cana (*Sphenophorus levis*) teve seu primeiro relato em cana-de-açúcar no final da década de 1970, tendo sido detectado inicialmente em 14 municípios na região de Piracicaba, SP (Precetti; Arrigoni, 1990). Ao longo dos anos, *S. levis* migrou para regiões em que não havia registros de sua presença, atingindo cerca de cinquenta municípios no ano de 2006. Nos três anos seguintes, atingiu uma centena de municípios, incluindo detecção nos estados do Paraná, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Esse aumento da praga na última década foi influenciado, principalmente, pela expansão da área cultivada de cana-de-açúcar, além de uma diminuição no rigor da qualidade fitossanitária das mudas transportadas para as novas áreas de plantio. As formas biológicas do inseto acompanharam os colmos utilizados, o que explica a rápida disseminação. O manejo de *S. levis* tem sido o desafio nas áreas de produção de cana-de-açúcar, pois se trata de praga de solo que permanece protegida durante a maior parte do ciclo biológico.

Os adultos possuem cerca de 10 mm a 15 mm de comprimento (Figura 12.3). As fêmeas perfuram a base das plantas e realizam a postura endofítica, colocando de 60 a 70 ovos/fêmea. No prazo de 7 a 12 dias, eclodem as larvas, responsáveis pela injúria às plantas. As larvas escavam galerias no interior dos caules subterrâneos (rizomas), nos internódios basais e, após o período de 30 a 60 dias transformam-se em pupas no interior do colmo. Após 7 a 15 dias aparecem os adultos, que possuem longevidade em torno de 200 dias (Precetti; Terán, 1983; Almeida et al., 2008).

A alimentação das larvas de *S. levis* causa diminuição na translocação da seiva das plantas, originando sintomas de amarelecimento de folhas, podendo evoluir para necrose, morte de perfilhos e até da touceira sob infesta-



Figura 12.3 – Cana-de-açúcar com sintoma típico do ataque da larva de *Sphenophorus levis*. No detalhe, os estágios da larva e adulto.

Foto: Enrico de Beni Arrigoni

ções severas. Como consequência, verificam-se falhas na rebrota, diminuição na produtividade e possível inviabilidade da manutenção do canavial com baixa produtividade. Este fato pode provocar a reforma antecipada do canavial, diminuindo a longevidade do ciclo de exploração da cultura, que resulta em maiores custos de produção. Além das perdas econômicas, esse inseto-praga pode ocasionar perdas na qualidade da matéria-prima, com consequências no rendimento industrial e na qualidade do açúcar e etanol produzidos.

O conceito de que o rendimento de uma planta é progressivamente reduzido por adversidades bióticas e abióticas (estressores) é amplamente conhecido. No entanto, pouco se sabe sobre o que acontece entre a ação dos estressores na planta e o rendimento (Peterson; Higley, 2001).

Condições ambientais provavelmente influenciam o número de pragas (e/ou comportamento), a resposta da planta ao ataque da praga, ou ambos (Higley; Peterson, 1996). Isto ocorre porque os insetos-pragas e as culturas são sistemas biológicos independentes e os estressores externos (abióticos ou bióticos) terão influência ou efeito em cada um, enfraquecendo ou fortalecendo uma posição biológica.

A resposta de uma planta à injúria de um inseto-praga, ou seja, à ação de um estressor, é dependente do estágio fenológico em que se encontram as plantas (Peterson et al., 1998) e do número de indivíduos, ou seja, da população de insetos-pragas que está atacando esta planta (Peterson; Higley, 2001). Partindo-se do princípio de que as plantas estão expostas aos fatores bióticos, um determinado estressor em potencial pode atuar isoladamente ou em conjunto com outro estressor, numa ação combinada, perfazendo uma interação de estressores. O significado científico do termo interação é o da dependência de um fator sobre outro (Sokal; Rohlf, 1981). Nesta perspectiva, qualquer fator que altera a resposta da planta frente a um estressor representa uma interação. A resposta da planta ao ataque de dois ou mais estressores combinados pode ser maior ou menor do que a soma das respostas aos mesmos estressores quando estes ocorrerem individualmente (Peterson; Higley, 2001).

Objetivando conhecer a resposta da cana-de-açúcar sob o ataque combinado de dois estressores bióticos: broca-do-colmo e a cigarrinha-das-raízes, estudos têm sido realizados. Neste contexto, a avaliação da capacidade fotossintética da planta se apresenta como importante ferramenta para elucidar os mecanismos envolvidos durante o ataque destas pragas. A taxa fotossintética da cana-de-açúcar é reduzida sob a presença e ação destes dois estressores bióticos, combinados ou isolados. Após o final da infestação das duas pragas, a taxa fotossintética das plantas é restabelecida (Gráfico 12.1).

No caso específico da broca-do-colmo, a formação de galerias decorrentes da alimentação do conteúdo interno do colmo pela praga pode causar estresse na planta por causa da interrupção dos feixes vasculares. Segundo Culy (2001), o impacto fisiológico desta perturbação vascular na planta é similar aos efeitos do estresse hídrico, pois há redução no transporte de água e de nutrientes para a expansão das folhas responsáveis pela fotossíntese. Com isso, há diminuição no desenvolvimento e redução do acúmulo de massa seca (Vaadia, 1985).

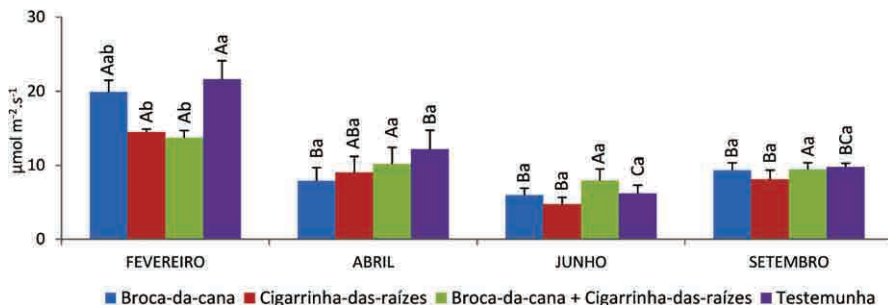


Gráfico 12.1 – Taxa fotossintética das plantas de cana-de-açúcar sob ataque dos estressores broca-do-colmo e cigarrinha-das-raízes, isolados ou combinados. As letras maiúsculas comparam épocas e as minúsculas os tratamentos.

Fonte: Rossato Junior et al., 2010

As ninfas da cigarrinha-das-raízes, ao sugarem os vasos condutores de seiva, principalmente o xilema radicular, provocam fechamento desses vasos condutores de seiva e desencadeiam a morte de raízes. Isso decorre tanto pelo hábito alimentar como por danos mecânicos provocados pelo estilete do inseto na alimentação (Garcia, et al., 2007). Como consequência, ocorre a redução da taxa fotossintética das plantas. Os insetos sugadores de seiva das plantas, de um modo geral, podem remover tecidos vegetais e interromper processos fisiológicos normais das plantas (Haile, 2001). Pode ocorrer a liberação de saliva rica em enzimas e aminoácidos que auxiliam no processo digestivo, porém de natureza tóxica para a planta, que resulta na morte de tecidos radiculares, comumente conhecido por necrose (Fewkes, 1969).

A injúria promovida pelo ataque de cigarrinha-das-raízes resulta em perda de rendimento por causa do impacto na fisiologia da planta, com a redução na fotossíntese por unidade de área foliar, e possível interrupção do fluxo de água e seiva e/ou a diminuição da absorção de água do solo. Consequentemente, este tipo de injúria pode reduzir o tamanho do dossel das plantas, indiretamente, em função de alterações na fisiologia da planta (Haile, 2001).

Dependendo do hábito alimentar do inseto, tem-se um determinado impacto na fotossíntese das plantas. No caso de insetos desfolhadores, comumente não ocorre declínio na taxa fotossintética das folhas remanescentes,

podendo, inclusive, levar a uma compensação, estimulando o crescimento das plantas (Welter, 1993; Peterson; Higley, 1998), ou ser prejudicial às mesmas resultando em redução da área foliar e do tecido remanescente (Macedo et al., 2003). No entanto, para insetos sugadores com ataque restrito à parte aérea das plantas, a injúria e/ou remoção de clorofila, a taxa de fotossíntese pode ser reduzida (Youngman; Barnes, 1986; Welter, 1993). Este mesmo prejuízo pode ser observado para o estressor biótico cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar, em que as ninfas atacam o sistema radicular das plantas e prejudicam drasticamente a taxa fotossintética das plantas.

Esse conhecimento da resposta fisiológica das plantas aos estressores é fundamental para o entendimento dos mecanismos de perda de rendimento. Embora a taxa fotossintética das plantas se restabeleça ao final das infestações das pragas, não é suficiente para compensar a perda sofrida sob os estressores e acaba invariavelmente afetando negativamente os parâmetros biométricos dos colmos (Rossato Junior et al., 2010).

As plantas atacadas por cigarrinha-das-raízes, isoladamente ou associada à broca-do-colmo, sofreram reduções de 10% e 8,9% no comprimento e 7,2% e 5,6% no diâmetro de colmos, respectivamente (Rossato Junior et al., 2011). A alimentação das ninfas provoca a desidratação e desnutrição dos colmos da cana-de-açúcar (Dinardo-Miranda, 2003). De modo semelhante, a fotossíntese contribui diretamente para o acúmulo de biomassa da planta, sendo que maiores taxas de fotossíntese nas folhas resultaram em maiores ganhos de produtividade (Haile, 2001). Desta forma, o ataque da cigarrinha-das-raízes influenciou negativamente no desenvolvimento da planta, com reflexos diretos na produtividade da matéria-prima. A redução de produtividade de colmos pelo ataque da cigarrinha-das-raízes foi de 17,6%, e pelo ataque da broca-do-colmo foi de 6,9%, enquanto a combinação dos dois estressores bióticos resultou na redução de 15,5% de colmos (Rossato Junior et al., 2011).

Colmos desidratados e secos são comumente encontrados em áreas de cana-de-açúcar sob o estressor cigarrinha-das-raízes (Figura 12.4). Esses danos são considerados extremamente severos e são consequência do reduzido armazenamento de açúcares nas folhas, provocado pela elevada demanda de água e açúcares requeridos pela fase jovem do inseto (Mendonça et al., 1996).





Figura 12.4 – Colmo seco entre colmos aparentemente saudáveis em função do ataque de ninfas de cigarrinha-das-raízes envolvidas pela espuma produzida.

## Qualidade da matéria-prima

A cana-de-açúcar manifesta a expressão de suas características genéticas, durante seu desenvolvimento, em função das condições ambientais disponíveis, tais como radiação solar, temperatura, umidade e fertilidade dos solos. De acordo com Stupiello (1989), o conceito de cana-de-açúcar com qualidade refere-se a colmos maduros, recém-cortados, saudáveis e livres de impurezas. Entretanto, considerando-se as transformações que estão ocorrendo nos processos de corte-carregamento e transporte, atualmente a conceituação de qualidade deve ser readequada à agroindústria da cana.

Sob esta ótica, a qualidade pode ser conceituada como convencional ou motivadora. No conceito convencional, a matéria-prima é avaliada a partir de características mínimas (Pol, Brix, Pureza, Fibra da cana, Umidade do Bagaço etc.) que possibilitem a melhoria e aproveitamento de recursos disponíveis, sem custos. Para o conceito motivador, a matéria-prima deve apresentar um conjunto de características que atendam ao processamento

sob dimensão mais ampla, estando diretamente ligada ao planejamento, incorporando serviços e custos.

A qualidade motivadora é a mais importante na busca de parâmetros que realmente contribuam para a melhoria da qualidade da matéria-prima, diminuindo custos, aumentando os rendimentos, as eficiências e, conseqüentemente, a rentabilidade da empresa (Stupiello, 1993). Os parâmetros utilizados são de determinação mais complexa, entretanto possibilitam diagnóstico mais seguro da qualidade da matéria-prima ou do estágio de deterioração. Dentre estes podem se destacar os teores de impurezas presentes na matéria-prima, acidez volátil, açúcar total e chochamento.

A qualidade tecnológica do caldo de cana é avaliada pela composição, que depende de fatores genéticos e ambientais, dos tratos culturais, estágio de maturação, sistema de colheita, processo de extração do caldo, dentre outros (Stupiello, 2001). A utilização de matéria-prima de qualidade favorece o processamento rápido com elevado rendimento de açúcar. A situação inversa também pode ser observada.

A incidência de estresses bióticos na cana-de-açúcar e seus efeitos sobre a qualidade da matéria-prima foram relatados em pesquisas realizadas por Blumer (1992), avaliando matéria-prima submetida ao ataque de *D. saccharalis*. Dinardo-Miranda et al. (1999), Gonçalves et al. (2003) e Ravaneli et al. (2006) verificaram comprometimento da matéria-prima atacada por *M. fimbriolata*.

Segundo Mutton (2003), em resposta ao ataque de insetos e patógenos podem ocorrer reações bioquímicas nas plantas, que desdobram os açúcares produzindo lignina, polissacarídeos e compostos fenólicos, com o objetivo de protegê-las do estresse biótico. Taiz e Zeiger (2004) relatam que os compostos fenólicos são as mais importantes substâncias de defesa produzidas pelas plantas contra o ataque de pragas e doenças. Destacam ainda que os principais compostos envolvidos com o mecanismo de resistência planta-praga são os taninos, flavonoides, isoflavonoides e lignina. Bi et al. (1997) citam o ácido clorogênico e a rutina como modelos de compostos fenólicos utilizados em estudos envolvendo defesa anti-herbivoria em plantas.

Fontaniella et al. (2003) encontraram elevada quantidade dos ácidos ferúlico, siríntrico e clorogênico em caldo de cana-de-açúcar infestado pela “síndrome da folha amarela” (YLF). Phelps e Young (1996) enfatizam que o ácido ferúlico e seus derivados conferem proteção às plantas contra o ata-

que de insetos, fungos e vírus. Esses compostos podem influenciar negativamente a qualidade da matéria-prima uma vez que são responsáveis pelo escurecimento do caldo e produção de açúcar com maior cor (Godshall, 1999), ou ainda atuar como inibidor da fermentação alcoólica, por meio da inibição da atividade enzimática das invertases (Polakovic et al., 1992).

Buscando avaliar os reflexos provocados pelo ataque de cigarrinha-das-raízes sobre colmos de cana-de-açúcar, diversos estudos foram realizados, evidenciando significativas reduções na qualidade tecnológica da cana. Estudos de Ravaneli (2010) confirmaram que os valores de Brix, Pol, Pureza e Açúcares Redutores Totais foram significativamente menores enquanto os teores de Açúcares Redutores e Compostos fenólicos aumentaram sempre que a cigarrinha-das-raízes danificou as plantas (Gráficos 12.2 e 12.3). Esse comportamento ocorre tanto em função do comprometimento do processo fotossintético, com redução do acúmulo de sacarose (Dinardo-Miranda et al., 2000a; Gonçalves et al., 2003; Ravaneli et al., 2006; Madaleno et al., 2008), quanto ao consumo dos açúcares armazenados para produzir moléculas de defesa contra o ataque da praga.

Os compostos fenólicos podem influenciar negativamente a qualidade da matéria-prima destinada ao processamento industrial, uma vez que são responsáveis pelo escurecimento do caldo e produção de açúcar com maior cor (Godshall, 1999), por atuar como inibidores da fermentação alcoólica (Polakovic et al., 1992), além de comprometer a produção de etanol. Semelhantemente, Ravaneli et al. (2006) verificaram aumento significativo nesses compostos quando os níveis de infestação de cigarrinha-das-raízes foi superior a duas ninfas/m. Resultados similares foram obtidos com outras variedades de cana-de-açúcar, tais como IAC83-2396, RB825336 (Dinardo-Miranda et al., 2001a); IAC82-2045 (Gonçalves et al., 2003) e SP80-1816 (Ravaneli et al., 2006).

Reduções significativas também foram verificadas para o pH do caldo para os diversos níveis de danos (Gráficos 12.4 e 12.5). Embora este parâmetro seja pouco sensível para avaliar a deterioração da cana, apresenta-se mais representativo quando combinado a acidez total, volátil e ácido láctico.

De modo semelhante, a dextrana e o manitol são compostos produzidos por bactérias lácticas, principalmente do gênero *Leuconostoc*, a partir do desdobramento da sacarose presente no caldo de cana (Eggleston, 2002; Eggleston; Harper, 2006). Como produtos dessa degradação também se podem

citar o ácido láctico e acético (Eggleston et al., 2004). Eggleston et al. (2007) relatam que o manitol é indicador de deterioração mais sensível que a dextrana e também pode ser produzido por outras espécies de bactérias lácticas.

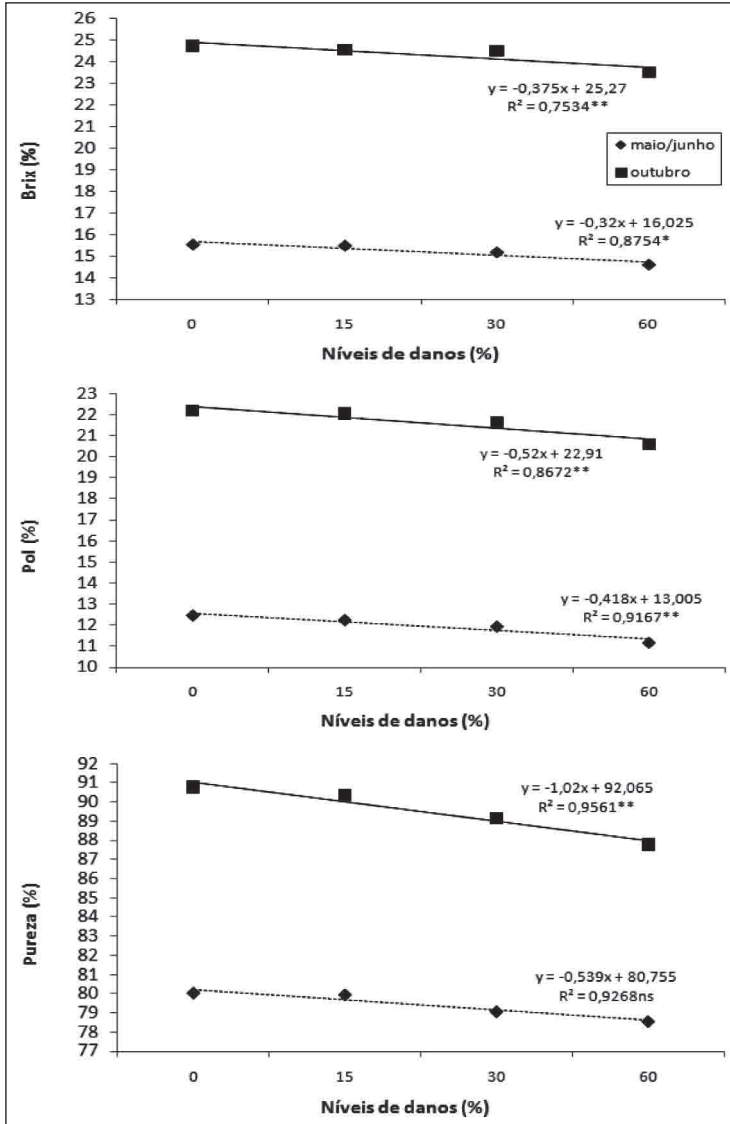


Gráfico 12.2 – Efeito dos danos causados por *M. fimbriolata* sobre parâmetros tecnológicos da matéria-prima em duas épocas de colheita na safra 2007/2008.

Fonte: Ravaneli, 2010

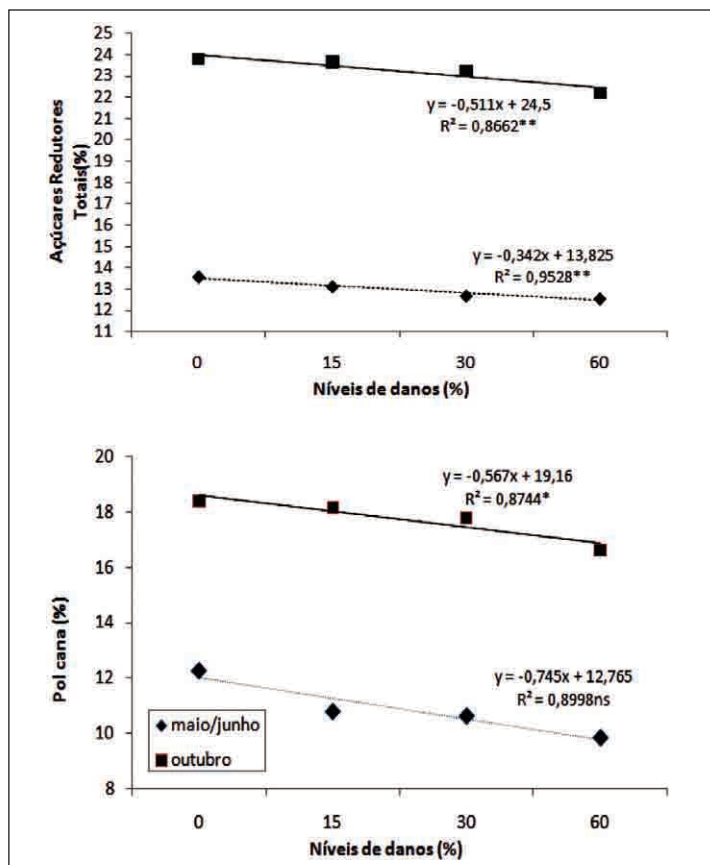


Gráfico 12.3 – Efeito dos danos causados por *M. fimbriolata* sobre parâmetros tecnológicos da matéria-prima nas duas épocas de colheita na safra 2007/2008.

Fonte: Ravaneli, 2010

Sob esse enfoque, o aumento da acidez do caldo é indicativo de deterioração microbiológica, em decorrência da contaminação bacteriana. Entretanto, convém ressaltar que a relação entre número de bactérias e produção de ácidos pode não ser direta, uma vez que a produção desses compostos ocorre em função da concentração e espécies de bactérias presentes no substrato (Ventura, 2007).

O ataque de cigarrinha-das-raízes provoca também aumento do teor de fibra da cana, resultante do estresse hídrico causado pela ação sugadora do inseto. Este efeito é mais expressivo quando se utiliza o cálculo da fibra por meio da metodologia proposta por Tanimoto (1964) (Gráfico 12.6).

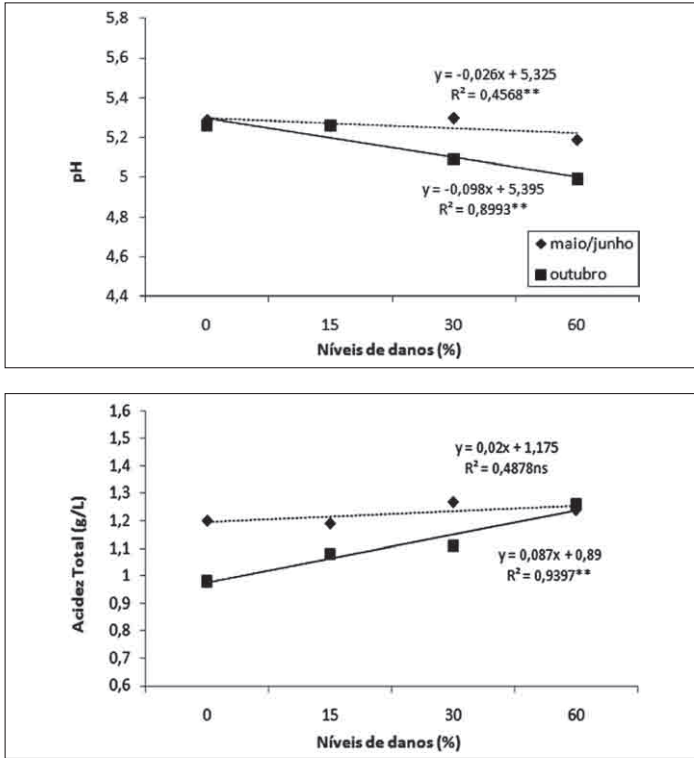


Gráfico 12.4 – Efeito dos danos causados por *M. fimbriolata* sobre pH, acidez total, volátil e ácido láctico no caldo, nas duas épocas de colheita, safra 2007/08.

Fonte: Ravaneli, 2010

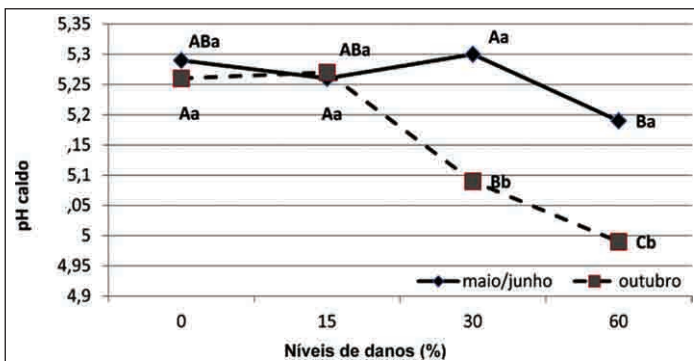


Gráfico 12.5 – Interação entre os fatores com níveis de infestação x épocas de colheita, para pH do caldo, safra 2007/2008. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de épocas de colheita. Letras minúsculas comparam épocas de colheita dentro de níveis de danos.

Fonte: Ravaneli, 2010

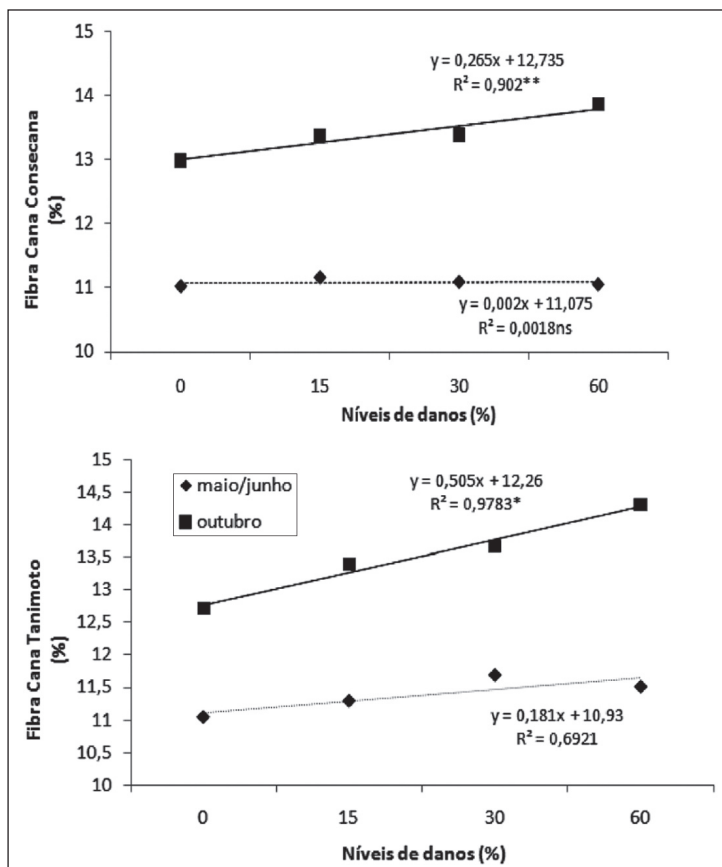


Gráfico 12.6 – Efeito dos danos causados por *M. fimbriolata* sobre a fibra da cana, nas duas épocas de colheita, safra 2007/2008.

Fonte: Ravaneli, 2010

## Reflexos sobre a produção de açúcar – Fluxograma e qualidade do açúcar

O processamento dos colmos de cana-de-açúcar para a produção de açúcar atende a uma sequência de operações, denominada fluxograma de produção. Os colmos maduros devem ser colhidos com os teores máximos de sacarose. Após o corte são transportados, pesados e avaliados quanto aos parâmetros de qualidade: Brix (teor de sólidos solúveis), Pol (teor “aparente” de sacarose), teor de fibra e açúcares totais recuperáveis (ATR, kg/t). Os colmos acrescidos de impurezas, denominados matéria-

-prima industrial, são encaminhados para o processo de extração do caldo por moendas ou difusores.

O caldo extraído é direcionado ao processo de clarificação para retirada das impurezas físicas e químicas, resultando no caldo clarificado com 16 a 18° Brix. A seguir, este é encaminhado ao setor de evaporação, para retirada de parte da água do caldo num evaporador de múltiplo efeito, dando origem ao xarope (solução saturada de açúcar de concentração 60° - 65° Brix).

O xarope será encaminhado ao cozimento resultando em uma solução supersaturada de açúcar denominada massa cozida, que é formada por uma mistura de cristais e mel. O cozimento é a etapa na qual são produzidos os cristais, por diversos métodos de nucleação, sendo o mais utilizado o de sementes. Após a etapa de cristalização realiza-se a centrifugação da massa cozida, para separar os cristais do mel residual.

Após a centrifugação, o açúcar é enviado aos processos finais de produção que consistem na secagem, classificação, embalagem e armazenamento do produto final. A qualidade do açúcar é aferida por alguns parâmetros de qualidade que são realizados constantemente pela fábrica e que definem as características do produto. Dentre esses se analisa a Pol, cor, cinzas, umidade, quantidade de amido e outros.

## **Clarificação do caldo de cana**

Estudos realizados por Madaleno (2010), avaliando os efeitos dos danos provocados pela cigarrinha-das-raízes na cana-de-açúcar, sobre a clarificação do caldo e reflexos sobre o açúcar produzido em duas épocas de colheita da safra 2007/2008, evidenciaram que o aumento dos níveis de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes não afetou a turbidez, velocidade de decantação e volume de cálcio utilizado para clarificação do caldo. Entretanto, quando se avaliou épocas (maio-junho e outubro da safra 2007/2008), verificou-se aumento na velocidade de decantação, no pH tratado, no volume de cálcio utilizado, no pH do caldo clarificado e na turbidez do caldo para a segunda época, pela melhor qualidade da matéria-prima. O caldo de cana apresentou redução na acidez na colheita realizada em outubro, houve aumento na formação de coloides mais densos, que se precipitaram com maior velocidade, proporcionando caldos com maior transparência.

Naturalmente, o aumento dos ácidos orgânicos ocorre da base para o ápice do colmo, onde há elevada atividade metabólica pelo crescimento de



tecidos imaturos, os quais decrescem quando a planta entra em estado de maturação (Celestine-Myrtill-Marlin, 1990). A precipitação do fosfato de cálcio pode ser influenciada negativamente pela presença de elevada quantidade do ácido aconítico, o qual possui preferência pelo cálcio disponível em relação ao ácido fosfórico (Pandey; Srinivasan, 1972), quando há formação dos flocos primários de decantação.

## Qualidade do açúcar produzido

Estudos de Madaleno (2010) evidenciaram que o aumento dos danos provocados pela cigarrinha-das-raízes reduziu a qualidade do açúcar. Houve elevação da cor e do teor de compostos fenólicos totais, cinzas e umidade dos cristais com a diminuição na qualidade da matéria-prima que entrou no processo de produção. Considerando-se as épocas de colheita dos colmos, observou-se a maior cor, teor de fenóis, cinzas, umidade e fator de segurança quando os colmos eram processados em maio-junho, enquanto a Pol foi maior na colheita de outubro. Esses resultados podem estar relacionados com a melhor clarificação ocorrida na segunda época quando o caldo apresentava características que facilitaram este processo. A melhor remoção de compostos fenólicos resultou em cristais de açúcar com menor coloração, com teores de Pol mais elevados, resultando em produto final com melhores características, possibilitando maior preço de comercialização.

O aumento da cor pode estar relacionado com o incremento nos compostos fenólicos totais (Gráfico 12.7). A etapa fundamental para a formação de cor a partir dos compostos fenólicos é a oxidação de monofenóis para difenóis e de o-difenóis para quinonas, pelas enzimas fenoloxidasas, cujo principal substrato é o ácido clorogênico (Chen; Chou, 1993).

O processamento de colmos maduros na colheita realizada em outubro resultou em menor cor do açúcar e reduzido teor de compostos fenólicos totais em relação à colheita de maio, à medida que incrementaram os danos promovidos pela praga. A clarificação em outubro removeu a maioria dos fenóis presentes no caldo. Em maio/junho, como a acidez do caldo estava mais elevada, houve dificuldade para obter a formação de complexos coloidais mais densos, o que deixou o caldo clarificado com turbidez mais elevada. Os compostos fenólicos remanescentes, após o cozimento, provavelmente permaneceram incluídos no cristal de açúcar alterando negativamente a cor, pois tornou-os mais escuros (Gráficos 12.8 e 12.9 e Figura 12.5).

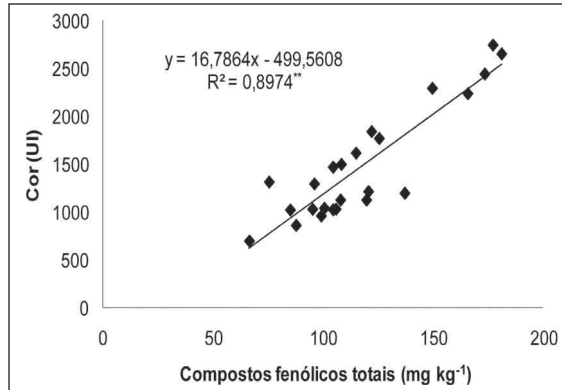


Gráfico 12.7 – Correlação entre a Cor do açúcar (ICUMSA – 420nm) e o teor de compostos fenólicos totais (mg kg<sup>-1</sup>) a partir de cana com danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes em diferentes épocas de colheita, (safra 2007/2008).

Fonte: Madaleno, 2010

A clarificação do caldo na primeira época não foi adequada quando se utilizou colmos com 30% de danos (Madaleno, 2010). Foi observado aumento de 41% nos teores de compostos fenólicos no açúcar que, conseqüentemente, elevaram a cor do produto final em 39%. Sendo esse açúcar comercializado, sofreria redução acentuada no preço em comparação ao tratamento com 0% de danos. Segundo Chen e Chou (1993), os contratos para comercialização penalizam o preço do açúcar em função de aumento de umidade, cinzas, dextrana e cor do produto.

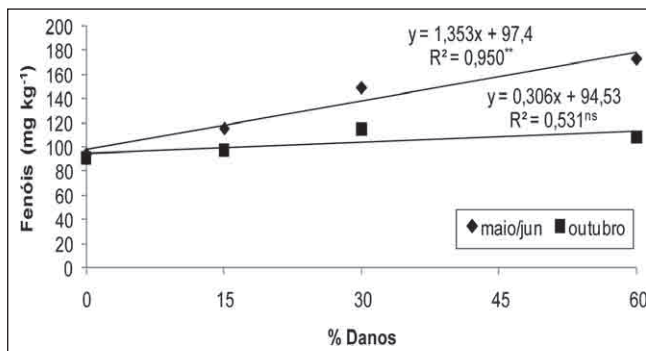


Gráfico 12.8 – Variação no teor de Compostos fenólicos totais (mg kg<sup>-1</sup>) do açúcar produzido em função da percentagem de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes, em duas épocas de colheita (safra 2007/2008).

Fonte: Madaleno, 2010

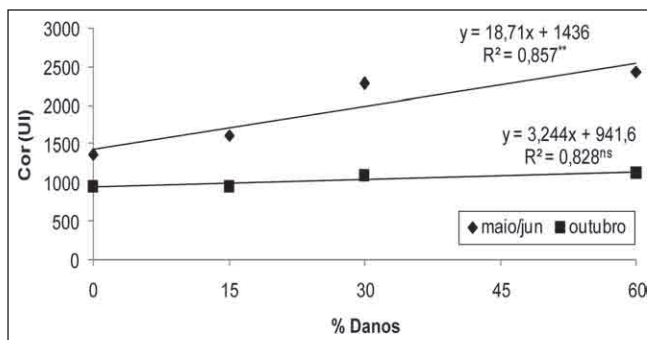


Gráfico 12.9 – Variação na Cor do açúcar (ICUMSA – 420nm) produzido em função da percentagem de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes, em duas épocas de colheita (safra 2007/2008).

Fonte: Madaleno, 2010

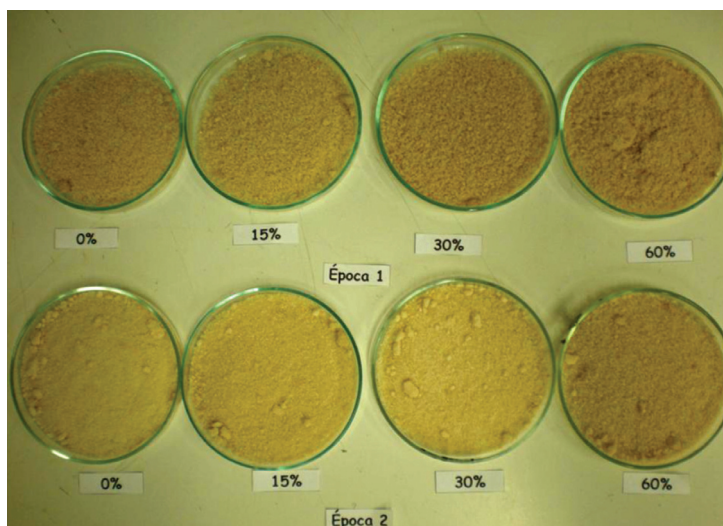


Figura 12.5 – Cor do açúcar produzido em função da percentagem de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes, em duas épocas de colheita (safra 2007/2008).

Fonte: Madaleno, 2010

A presença de maior nível de danos de cigarrinha-das-raízes resultou na produção de cristal com maior teor de cinzas (Madaleno, 2010), sendo esse efeito menor em outubro, em razão do melhor desempenho da clarificação do caldo nessa época (Gráfico 12.10). O teor de cinza elevado no açú-

car VHP, que é destinado ao refino, aumenta o efeito melassigênico se seu constituinte principal for o potássio, implicando em perda de sacarose no mel final, porém, se a maior quantidade for de íon cálcio poderá haver tendência de aumento de incrustações nos aparelhos que realizam o cozimento do açúcar refinado. A partir de 30% de danos nos colmos houve incremento de 29% nas cinzas no açúcar da cana colhida em maio-junho (Gráfico 12.10). Estas cinzas podem ser originadas de traços de fosfatos de cálcio e magnésio, sílica, sesquióxidos, Ca-organatos e outros, em suspensão no caldo clarificado e no xarope (Chen; Chou, 1993). A maior acidez do caldo extraído na primeira época pode ter interferido negativamente na formação e precipitação dos coloides, resultando em resíduos do íon Ca que permaneceram no caldo clarificado e, posteriormente, no açúcar.

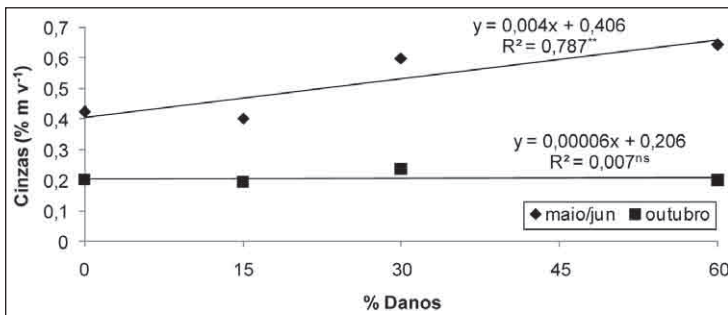


Gráfico 12.10 – Variação para o teor de Cinzas (% m v<sup>-1</sup>) do açúcar produzido em função da percentagem de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes, em duas épocas de colheita (safra 2007/2008).

Fonte: Madaleno, 2010

Os danos promovidos pelas cigarrinha-das-raízes em 30% resultaram em aumento na umidade final do açúcar em 22% na época maio-junho (Gráfico 12.11). Entretanto, para o armazenamento também deve ser considerado o teor de Pol nesse açúcar. A umidade é o fator que determina a velocidade de deterioração do açúcar, principalmente no armazenamento do produto. O aumento do teor de água, que envolve os cristais de sacarose, pode ser apropriado para o crescimento da contaminação microbológica. Sob estas condições de armazenamento, os cristais apresentam aumento de cor, de duas a três vezes do que quando submetido a secagem (Chen; Chou, 1993).

Apesar da umidade do açúcar ter variado entre a composição de danos, o fator de segurança permaneceu em valor médio de 0,17 abaixo do exigido para o armazenamento do açúcar, que é de 0,25 para as indústrias brasileiras. O fator de segurança é utilizado pela indústria para determinar a relação de não açúcares (não Pol) e a umidade no filme de mel que envolve os cristais e não pode exceder um terço dos não Pol, sendo que nesses valores a pressão osmótica é elevada e há inibição na propagação de microrganismos que deterioram os cristais (ibidem).

Os teores de amido no açúcar não foram alterados pelos danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes ou pelas épocas de colheita. Provavelmente, esse polissacarídeo, que é responsável pela diminuição da cristalização no xarope e perda na remoção de sacarose do mel, caracterize melhor as diferenças entre variedades de cana-de-açúcar, como relatam Simioni et. al. (2006), do que a alteração pelo aumento de danos nos colmos promovidos por insetos.

Os resultados indicaram que o controle eficiente desse inseto, além de proporcionar maior produtividade ao canavial, pode facilitar a recuperação do açúcar produzido durante o processamento industrial, com reflexos positivos na qualidade do produto. A época de colheita também deve ser observada, pois o estágio de maturação da planta influi diretamente na qualidade da clarificação, que, se não for realizada em condições adequadas de amadurecimento, pode evidenciar os danos promovidos pelo inseto no produto final.

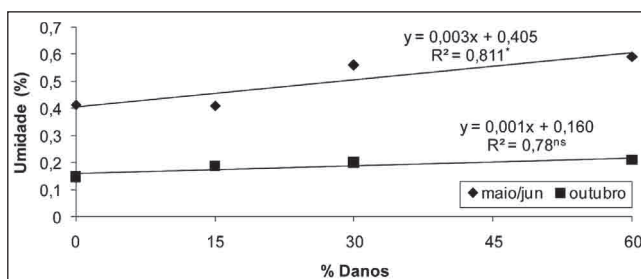


Gráfico 12.11 – Variação no teor de Umidade (%) do açúcar produzido em função da percentagem de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes, em duas épocas de colheita (safra 2007/2008).

## Reflexos sobre o processo fermentativo e produção de etanol – Características importantes para o processo fermentativo

A fermentação alcoólica é a principal etapa do processo de produção de álcool, pois nela o açúcar e outros componentes do mosto são transformados em álcool etílico, gás carbônico e compostos secundários. Participam desse processo, além da levedura, que é o principal agente, outros microrganismos que são introduzidos involuntariamente no sistema. Tais microrganismos são indesejáveis e responsáveis pela redução do rendimento alcoólico e depreciação na qualidade do produto final. Sendo um organismo vivo, a levedura apresenta, para seu desempenho, certas exigências que lhe permitem desenvolver o metabolismo de maneira adequada e, conseqüentemente, a obtenção de produto final com características que atendam às exigências do mercado (Novaes, 1992).

As leveduras de panificação possuem baixa taxa de permanência nas fermentações industriais (Basso et al., 1993). Sendo assim, a matéria-prima e as condições operacionais podem influenciar sensivelmente a estabilidade e o desempenho das leveduras durante a fermentação. Mutton e Mutton (2002) ressaltam a importância do estudo do comportamento da microbiota fermentativa frente ao mosto proveniente de cana danificada, uma vez que a eficiência do processo fermentativo pode ser diretamente influenciada pelos componentes do caldo. Além da qualidade da matéria-prima, outros fatores afetam o processo fermentativo, tais como pH, acidez, temperatura, concentração de açúcares do meio, etanol, disponibilidade de nutrientes e presença de microrganismos contaminantes.

As leveduras são células eucarióticas altamente tolerantes às variações do pH do meio, sendo por isso denominadas acidófilas. Contudo, o pH ideal para um eficiente desempenho fermentativo está na faixa de 4,0 a 4,5. A correção do pH é importante tanto para a multiplicação como para o processo fermentativo e, na prática, é feita com a aplicação de ácido sulfúrico (Angelis, 1992). Chaves e Póvoa (1992) afirmam que a acidez natural verificada no caldo de cana é praticamente suficiente quando consideramos os valores requeridos para a fermentação adequada. Embora algumas vezes o tratamento ácido se mostre estressante para a levedura, esse fator reduz a multiplicação das bactérias minimizando a contaminação (Amorim et al., 1996).

Segundo Narendranath et al. (2001), os principais ácidos encontrados na fermentação alcoólica são o acético e o lático, inibidores do crescimento das leveduras. O ácido acético é formado em pequenas quantidades na fermentação, enquanto o ácido lático é o principal metabólito produzido pelas bactérias lácticas. A presença de ácidos orgânicos, como o acético e lático, resultam em aumento no consumo de ATP pela levedura. Nessas condições, parte do ATP que seria utilizado para crescimento ou fermentação é desviado para manutenção do pH interno.

Ao mesmo tempo, a temperatura ideal para o metabolismo das leveduras durante a fermentação deve estar entre 28°C e 34°C. As temperaturas inferiores a 30°C-32°C prolongam o tempo de fermentação, enquanto temperaturas elevadas inibem o crescimento celular, especialmente na presença de elevados teores de etanol (Stupiello; Horii, 1981). De acordo com Angelis (1992), sob temperaturas abaixo da faixa ideal, as leveduras gastam mais energia para completar o ciclo celular, enquanto em temperaturas muito elevadas, acima de 40°C, a maioria deixa de se multiplicar, perde a viabilidade, favorecendo o desenvolvimento de bactérias.

Segundo Stokes (1971), o etanol tem efeito inibidor sobre as leveduras, paralisando o crescimento celular quando em concentrações relativamente baixas e a fermentação quando em concentrações mais elevadas. Halls-worth (1998) relata que concentrações de etanol próximas a 5% limitam o crescimento e as atividades metabólicas das leveduras, afetando o controle osmótico, induzindo o estresse hídrico.

A concentração de açúcares pode afetar tanto a produção da biomassa celular da levedura como o processo fermentativo (Angelis, 1992). Segundo Stupiello e Horii (1981), as células de leveduras em presença de teores elevados de açúcares, mesmo na presença de oxigênio, têm a respiração reprimida e tendem a fermentar pela inibição da atividade de enzimas respiratórias e consequente inatividade das mitocôndrias, no chamado efeito Crabtree.

Elevadas concentrações de açúcares nos mostos resultam em elevados teores alcoólicos, podendo comprometer a viabilidade das células ou ainda favorecer fermentações lentas e incompletas, com formação de subprodutos, reduzindo o rendimento alcoólico e a viabilidade celular da levedura, favorecendo as contaminações (Angelis, 1992). Neste contexto, o preparo do mosto, a concentração de açúcar total deve ser compatível com a na-

tureza e composição da matéria-prima, levedura empregada e processo de condução da fermentação (Stupiello; Horii, 1981).

Do ponto de vista nutricional, o nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, magnésio, manganês, zinco e o cálcio são elementos considerados fundamentais para as leveduras, considerando-se sua estrutura celular, o desdobramento de açúcares e os processos metabólicos vitais (Amorim, 1985). A exigência nutricional depende da concentração desses elementos no meio, estando diretamente ligados à linhagem da levedura utilizada no processo. O enxofre, potássio, manganês e cobalto são especialmente importantes por facilitarem as atividades enzimáticas (Amorim et al., 1996).

O caldo de cana constitui um ótimo substrato para o crescimento de microrganismos, graças aos elevados teores de nutrientes, de água, pH e temperatura favoráveis (Gallo, 1992). A presença de microrganismos contaminantes, carreados com a matéria-prima do campo, por ocasião das operações de corte-carregamento-transporte e o processo de extração podem apresentar-se muito elevados, resultando em infecções da fermentação (Stupiello; Horii, 1981).

Dentre os microrganismos responsáveis pela redução no rendimento da fermentação alcoólica destacam-se as bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Clostridium*, *Aerobacter*, *Streptococcus* (Amorim; Oliveira, 1982), *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Streptomices*, *Actinomyces*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Lactobacillus* (Bevan; Bond, 1971) e os fungos (leveduras e bolores) como *Saccharomyces*, *Torula*, *Pichia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* (ibidem) e *Candida* (Cabrini; Gallo, 1999).

As bactérias deterioram rapidamente a cana colhida e provocam alterações desfavoráveis às leveduras durante o processo fermentativo, tais como floculação e perda do fermento, consumo de sacarose e outros nutrientes do mosto, comprometendo o rendimento alcoólico (Gallo, 1992).

Segundo Amorim e Oliveira (1982), bactérias do gênero *Leuconostoc* e *Bacillus* quebram a sacarose, formando polímeros de alto peso molecular, que são constituídos por resíduos de glicose ou frutose. Estes polímeros entopem trocadores de calor e canalizações, aumentando a viscosidade do vinho, entupindo as centrífugas. As bactérias do gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter* oxidam o álcool etílico em ácido acético, aumentando a acidez



volátil e fixa nos vinhos. As dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Pediococcus* produzem grande quantidade de ácido lático a partir da glicose, enquanto as do gênero *Clostridium* são responsáveis pela formação dos ácidos butírico, fórmico e acético (Yokoya, 1995).

## Influências sobre o mosto e processo fermentativo

Estudos realizados têm confirmado redução significativa nos teores de Açúcares Redutores Totais (ART) presentes no mosto com o aumento de danos causados pela cigarrinha-das-raízes (Tabela 12.1 e Gráfico 12.12). Com relação às épocas de avaliação (maio/junho e outubro da safra 2007/2008), Ravaneli (2010) verificou aumento nos teores de ART e redução da acidez total quando a colheita dos colmos foi realizada no final de safra.

Os compostos fenólicos atuam como inibidores do metabolismo das leveduras (Polakovic et al., 1992; Stuppiello, 2002), refletindo em significativas perdas no rendimento alcoólico e alterações na composição do destilado (Ravaneli, 2005). Com o maior nível de danos promovidos por *M. fimbriolata* verificou-se discreto aumento nos compostos fenólicos totais no mosto (Tabela 12.1), principalmente a partir de 30% de dano nos colmos. Estes resultados corroboram observações de Godshall (1999), relatando que o processo de clarificação do caldo não remove o excesso dessas biomoléculas. Em muitas unidades produtoras para o preparo do mosto é realizado o processo de clarificação branda (até pH 6, no processo de caleagem) no caldo, com o objetivo de retirar impurezas na matéria-prima utilizada para a produção do mosto.

## Avaliação dos nutrientes do caldo e do mosto

Garcia et al. (2007) relataram que as ninfas da *M. fimbriolata* sugam as raízes da cana-de-açúcar afetando o xilema e o floema da planta. Garcia (2009) observou que o ataque da praga não afetou as quantidades de nutrientes absorvidos pela planta e presentes na massa seca do colmo, no caldo e no mosto (Tabelas 12.2, 12.3 e 12.4). Verificou-se que grande parte do fósforo, potássio, magnésio, cálcio, manganês, ferro e zinco contidos na massa seca, apenas o nitrogênio e o enxofre foram exportados em maiores quantidades para o caldo extraído.

Tabela 12.1 – Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) para parâmetros tecnológicos do mosto: açúcares redutores totais (ART), acidez total e compostos fenólicos totais

	Causas de variação	ART	Acidez total	Comp. Fenólicos Totais
		%	gH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L	µg/mL
Níveis de danos (A)	0%	12,71A	1,39A	230,01A
	15%	12,47A	1,36A	233,41A
	30%	12,39AB	1,43A	249,74A
	60%	11,94B	1,48A	254,52A
	Teste F (A)	6,09**	1,16 <sup>ns</sup>	3,21*
	DMS (Tukey)	0,48	0,17	24,79
Épocas (B)	maio/junho	11,55B	1,73A	245,96A
	Outubro	13,20A	1,10B	237,88A
	Teste F (B)	164,61**	181,08**	1,44 <sup>ns</sup>
	DMS (Tukey)	0,25	0,09	13,29
	Teste F (A x B)	1,24 <sup>ns</sup>	0,39 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>
	CV (%)	5,71	17,94	15,19

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns = não significativo; \* = significativo ao nível de 5%; \*\* = significativo ao nível de 1%

Fonte: Garcia, 2009

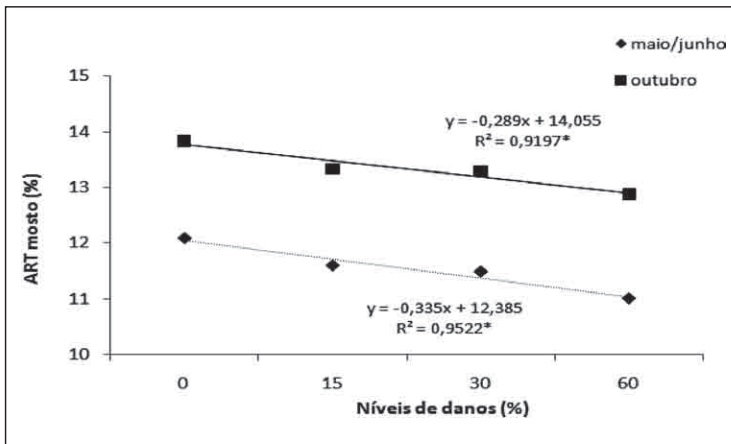


Gráfico 12.12 – Efeito dos danos causados por *M. fimbriolata* sobre os açúcares redutores totais do mosto (%), nas duas épocas de colheita.

Fonte: Ravaneli, 2010

Tabela 12.2 – Valores médios dos nutrientes presentes na massa seca da cana

Causas de variação	Massa seca										
	N	P	K	S	Mg	Ca	Mn	Fe	Zn		
	mg/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg		
0%	7,114A	0,987A	6,437A	0,070A	0,727A	0,798A	24,125A	226,250A	3,722A		
15%	6,812A	0,958A	6,598A	0,0712A	0,754A	0,832A	23,501A	217,708A	4,083A		
30%	7,198A	0,978A	7,108A	0,074A	0,821A	0,895A	24,887A	197,375A	4,001A		
60%	6,857A	0,973A	7,617A	0,087A	0,899A	1,024A	25,916A	232,292A	5,258A		
F	1,446 <sup>ns</sup>	0,095 <sup>ns</sup>	1,499 <sup>ns</sup>	2,876 <sup>ns</sup>	2,150 <sup>ns</sup>	2,522 <sup>ns</sup>	0,444 <sup>ns</sup>	0,472 <sup>ns</sup>	2,554 <sup>ns</sup>		
DMS (Tukey)	0,585	0,148	1,622	0,017	0,194	0,232	5,794	82,27	1,576		
maio/junho	7,3544A	1,227A	10,253A	0,090A	0,942A	1,072A	24,083A	253,771A	4,844A		
outubro	6,636B	0,721B	3,624B	0,061B	0,658B	0,702B	25,132A	183,042B	3,687B		
F	20,683 <sup>**</sup>	158,558 <sup>**</sup>	229,70 <sup>**</sup>	38,181 <sup>**</sup>	29,410 <sup>**</sup>	34,621 <sup>**</sup>	0,449 <sup>ns</sup>	10,163 <sup>**</sup>	7,406 <sup>**</sup>		
DMS (Tukey)	0,314	0,079	0,869	0,009	0,104	0,125	3,105	44,097	0,845		
A x B	0,443 <sup>ns</sup>	0,547 <sup>ns</sup>	0,438 <sup>ns</sup>	0,161 <sup>ns</sup>	0,399 <sup>ns</sup>	0,434 <sup>ns</sup>	0,245 <sup>ns</sup>	0,717 <sup>ns</sup>	1,780 <sup>ns</sup>		
CV (%)	11,051	20,195	30,885	30,423	32,051	34,634	31,109	49,765	48,817		

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; \* = significativo ao nível de 5%; \*\* = significativo ao nível de 1%

Fonte: Garcia, 2009

Tabela 12.3 – Valores médios dos nutrientes presentes no caldo extraído

Causas de variação	Caldo										
	N	P	K	S	Mg	Ca	Mn	Fe	Zn		
	g/L	mg/L	g/L	g/L	g/L	g/L	mg/L	mg/L	mg/L		
0%	0,648A	37,896A	1,263A	0,132A	0,1379A	0,108A	3,172A	14,429A	0,712A		
15%	0,714A	33,321A	1,047A	0,132A	0,114A	0,092A	3,004A	13,558A	0,701A		
30%	0,687A	36,751A	1,321A	0,144A	0,146A	0,106A	3,229A	15,062A	0,720A		
60%	0,6960A	36,922A	1,407A	0,150A	0,152A	1,120A	3,150A	16,779A	0,795A		
F	1,929 <sup>ns</sup>	0,308 <sup>ns</sup>	1,219 <sup>ns</sup>	0,451 <sup>ns</sup>	1,152 <sup>us</sup>	0,799 <sup>ns</sup>	0,114 <sup>ns</sup>	0,348 <sup>ns</sup>	0,526 <sup>ns</sup>		
DMS (Tukey)	0,074	12,975	0,515	0,049	0,057	0,047	1,053	8,555	0,221		
maio/junho	0,569A	48,902A	1,819A	0,159A	0,168A	0,118A	2,933A	20,312A	0,773A		
outubro	0,803B	23,042B	0,701B	0,120B	0,106B	0,095B	3,344A	9,602B	0,692B		
F	136,533 <sup>**</sup>	54,613 <sup>**</sup>	64,873 <sup>**</sup>	8,672 <sup>**</sup>	16,236 <sup>**</sup>	3,272 <sup>ns</sup>	2,093 <sup>ns</sup>	21,548 <sup>**</sup>	1,860 <sup>ns</sup>		
DMS (Tukey)	0,039	6,955	0,276	0,026	0,031	0,025	0,564	4,586	0,118		
A x B	0,342 <sup>ns</sup>	0,883 <sup>ns</sup>	0,455 <sup>ns</sup>	0,348 <sup>ns</sup>	0,458 <sup>us</sup>	0,026 <sup>ns</sup>	0,189 <sup>ns</sup>	0,216 <sup>ns</sup>	1,569 <sup>ns</sup>		
CV (%)	14,257	47,654	54,019	46,596	54,853	58,775	44,346	75,571	39,855		

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; \* = significativo ao nível de 5%; \*\* = significativo ao nível de 1%

Fonte: Garcia, 2009

Tabela 12.4 – Valores médios dos nutrientes presentes no mosto utilizado para a fermentação

Causas de variação	Mosto										
	N	P	K	S	Mg	Ca	Mn	Fe	Zn		
	g/L	mg/L	g/L	g/L	g/L	g/L	mg/L	mg/L	mg/L		
0%	0,292A	30,261A	1,613A	0,490A	0,156A	0,295A	0,233A	0,904A	0,250A		
15%	0,286A	25,628A	1,478A	0,510A	0,149A	0,266A	0,233A	1,050A	0,235A		
30%	0,288A	29,264A	1,775A	0,498A	0,160A	0,315A	0,263A	1,228A	0,245A		
60%	0,283A	28,844A	1,7812A	0,512A	0,167A	0,319A	0,283A	1,352A	0,298A		
F	0,159 <sup>ns</sup>	0,985 <sup>ns</sup>	2,210 <sup>ns</sup>	0,135 <sup>ns</sup>	0,391 <sup>ns</sup>	1,846 <sup>ns</sup>	1,325 <sup>ns</sup>	1,429 <sup>ns</sup>	0,825 <sup>ns</sup>		
DMS(Tukey)	0,036	7,488	0,362	0,104	0,043	0,066	0,078	0,615	0,115		
maio/junho	0,311A	40,621A	2,261A	0,517A	0,151A	0,329A	0,252A	1,299A	0,295A		
outubro	0,264B	16,378B	1,064B	0,489B	0,166B	0,268B	0,254A	0,967B	0,219B		
F	24,468**	144,112**	149,912**	0,912 <sup>ns</sup>	1,778 <sup>ns</sup>	12,116**	0,012 <sup>ns</sup>	4,073*	5,973*		
DMS(Tukey)	0,191	1,014	0,194	0,056	0,023	0,035	0,042	0,329	0,062		
A x B	0,759 <sup>ns</sup>	1,040	0,130 <sup>ns</sup>	0,848 <sup>ns</sup>	1,644 <sup>ns</sup>	1,877 <sup>ns</sup>	0,691 <sup>ns</sup>	0,323 <sup>ns</sup>	1,168 <sup>ns</sup>		
CV (%)	16,362	34,714	28,814	27,413	36,179	29,051	40,802	61,627	59,317		

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo; \* = significativo ao nível de 5%; \*\* = significativo ao nível de 1%

Fonte: Garcia, 2009

O caldo extraído foi submetido ao processo de clarificação com a finalidade de remover impurezas; entretanto, constatou-se que houve remoção de alguns nutrientes, como nitrogênio, fósforo, manganês, ferro e zinco que apresentaram menores quantidades no mosto (Tabelas 12.3 e 12.4), corroborando informações de Amorim (2005). Os teores de magnésio e cálcio aumentaram em função da utilização de hidróxido de cálcio na forma de leite de cal para a clarificação, com a função de corrigir o pH. Ocorreu também aumento do enxofre como resultado do uso do ácido sulfúrico para ajustar o pH do mosto.

Considerando-se que a clarificação remove nutrientes, deve-se realizar suplementação de fósforo manganês e zinco no mosto a ser utilizado para que o processo fermentativo seja otimizado. Stupiello e Horil (1981) e Amorim (2005) recomendam valores entre 125 ppm a 150 ppm de  $P_2O_5$  e de 1 a 5 mg/L de manganês e zinco no mosto.

As quantidades de nutrientes presentes nos colmos, no caldo e no mosto, no final da safra, foram significativamente menores em relação ao do início da safra (Tabelas 12.2, 12.3 e 12.4). Entre o início e o final da safra, a cultura passou por um período de estresse hídrico, que interferiu na taxa de absorção de água e de nutrientes. Deve-se considerar ainda que a planta apresentou consumo para manutenção de suas atividades fisiológicas.

## Comportamento microbiológico

A microbiota presente no caldo apresenta características bastante variadas, uma vez que a cana-de-açúcar abriga em seu ecossistema elevada diversidade de microrganismos próprios, que constituem fonte natural de contaminantes no momento em que as operações de colheita e processamento são realizadas. Segundo Mutton e Mutton (2002), o reflexo direto da qualidade da matéria-prima pode ser observado no processo fermentativo, uma vez que é diretamente afetado pelos componentes do caldo. Portanto, é de grande importância o conhecimento do comportamento das leveduras fermentadoras quando inoculadas em mosto proveniente de canas estressadas ou injuriadas.

Ravaneli (2005), estudando diferentes níveis de infestação de *M. fimbriolata*, observou maior número de colônias de leveduras selvagens no

caldo e mosto com o aumento dos danos, o que também foi observado por Ravaneli (2010), conforme Gráfico 12.13.

No caldo foi observado aumento no número de colônias de bactérias lácticas com o aumento dos danos causados pela praga (Gráfico 12.14). Este resultado pode ser confirmado por meio do aumento na acidez volátil do caldo, indicando que as bactérias presentes nos tratamentos com maiores danos consumiram parte da sacarose presente, produzindo ácidos orgânicos. Pôde-se observar que, apesar das fermentações terem iniciado com inóculo prensado, houve o desenvolvimento de outras leveduras, em função da microbiota presente na cana.

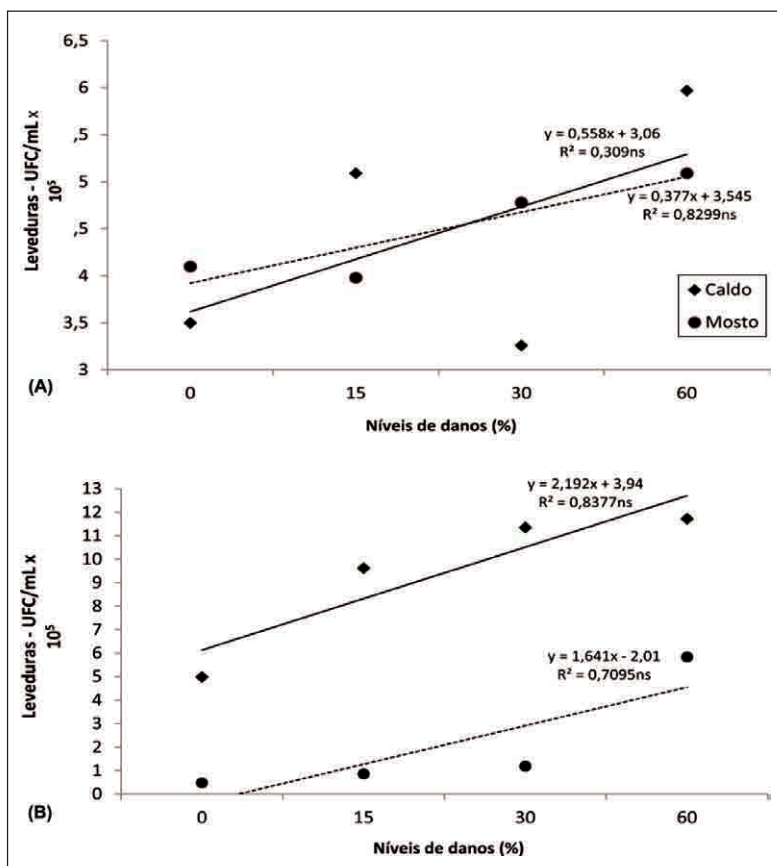


Gráfico 12.13 – Contagem de colônias de leveduras no caldo e mosto nas duas épocas de colheita, safra 2007/2008. (A) colheita de maio/junho; (B) colheita de outubro.

Fonte: Ravaneli, 2010

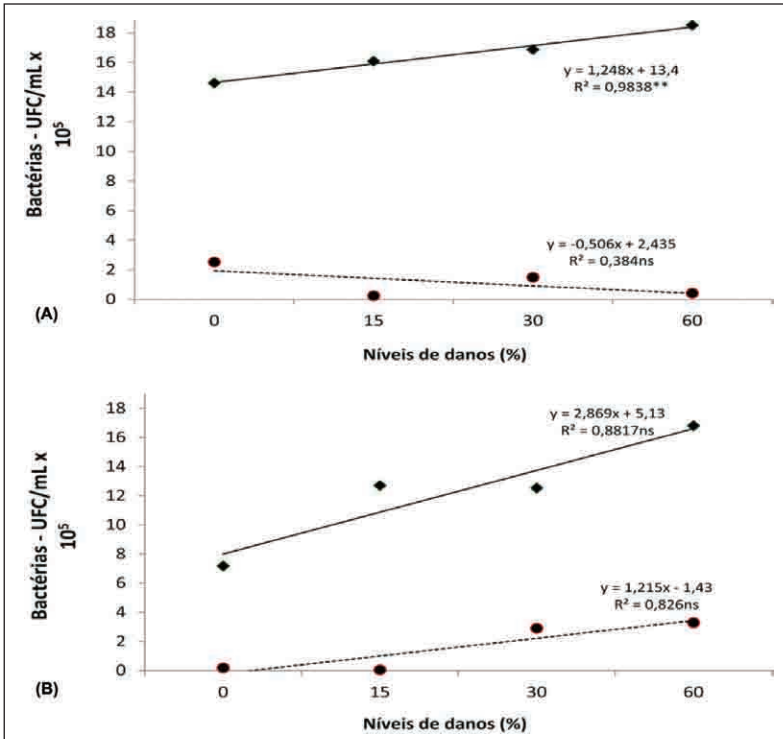


Gráfico 12.14 – Contagem de colônias de bactérias no caldo e mosto nas duas épocas de colheita, safra 2007/2008. A: colheita de maio/junho; B: colheita de outubro.

Fonte: Ravaneli, 2010

A microbiota fermentadora foi influenciada diretamente pela presença de biomoléculas de defesa, tais como os compostos fenólicos. Segundo Ravaneli (2010), estes são proporcionais ao aumento dos níveis de danos causados por *M. fimbriolata*, independentemente da época de colheita realizada.

De modo semelhante, Ravaneli et al. (2011) observaram redução da viabilidade de brotos viáveis das leveduras de 98,9% (na inoculação), para 93,4% após 50 minutos de processo. Ao final da fermentação observou-se redução da viabilidade celular que foi proporcional ao nível de dano sofrido pela matéria-prima (Gráfico 12.15). A queda na viabilidade celular está associada a diversos fatores, tais como disponibilidade de nutrientes e presença de contaminantes, decorrentes da matéria-prima deteriorada. Resultados semelhantes foram observados em estudos desenvolvidos por Gonçalves (2003) e Ravaneli et al. (2006).



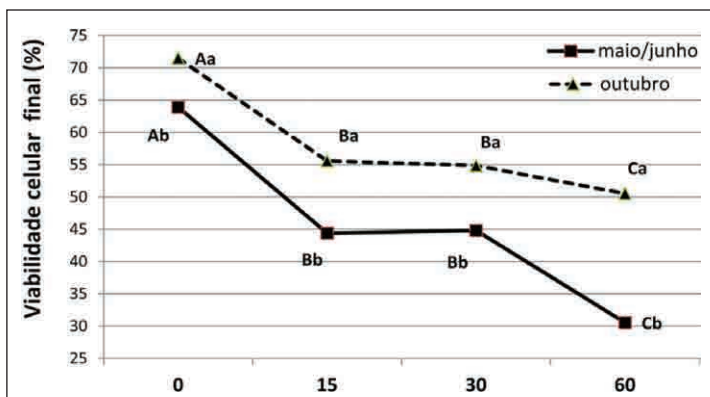


Gráfico 12.15 – Interação entre níveis de danos e épocas de colheita para viabilidade celular de leveduras no final da fermentação. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de níveis de danos. Os resultados correspondem às médias de dez ciclos fermentativos.

Fonte: Ravaneli et al., 2011

Deve-se considerar ainda que a condução do processo fermentativo é realizada de modo contínuo, por ciclos sucessivos, com a reutilização do inóculo. Quando a matéria-prima empregada para a composição do mosto está comprometida, verifica-se redução da viabilidade celular no decorrer dos ciclos fermentativos, tanto no início quanto no final do processo (Gráficos 12.16 e 12.17). A queda na viabilidade ao longo dos ciclos é decorrente do estresse acumulado pela levedura, em função da presença das biomoléculas inibidoras do processo fermentativo, tais como compostos fenólicos e ácidos, além da presença dos contaminantes.

A porcentagem de células e brotos viáveis durante a fermentação é de extrema importância para a manutenção da população de leveduras, sendo o monitoramento periódico imprescindível. Além de metabólitos indesejáveis contidos na matéria-prima, deve-se considerar ainda a presença de compostos tóxicos às leveduras que são produzidos durante a fermentação acarretando perdas da viabilidade, com consequente redução da eficiência industrial (Okolo et al., 1987). Ravaneli (2010) observou diferença significativa na viabilidade de brotos para níveis de infestação no início da fermentação ( $t = 50$  minutos), com tendência similar no final do processo (Gráfico 12.18), e maior porcentagem de brotos viáveis foi observado para a colheita realizada no final de safra.

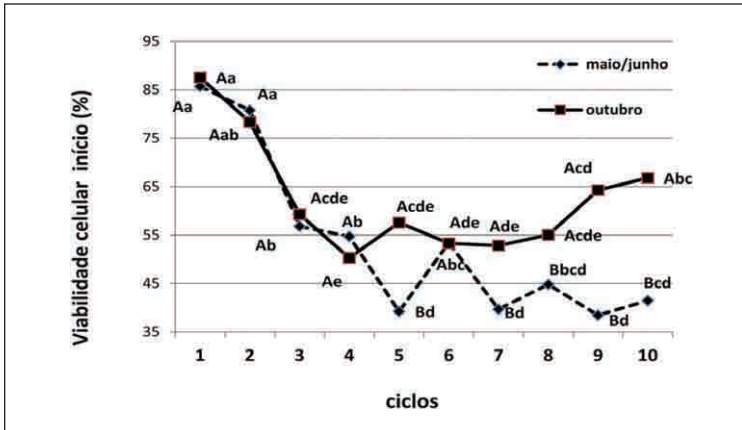


Gráfico 12.16 – Interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para viabilidade celular de leveduras no início da fermentação. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*, na safra 2007/2008.

Fonte: Ravaneli et al., 2011

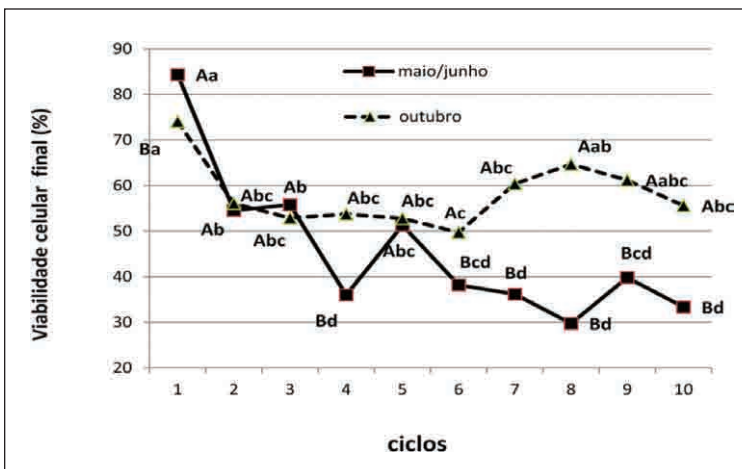


Gráfico 12.17 – Interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para viabilidade celular de leveduras no final da fermentação. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*, na safra 2007/2008.

Fonte: Ravaneli et al., 2011

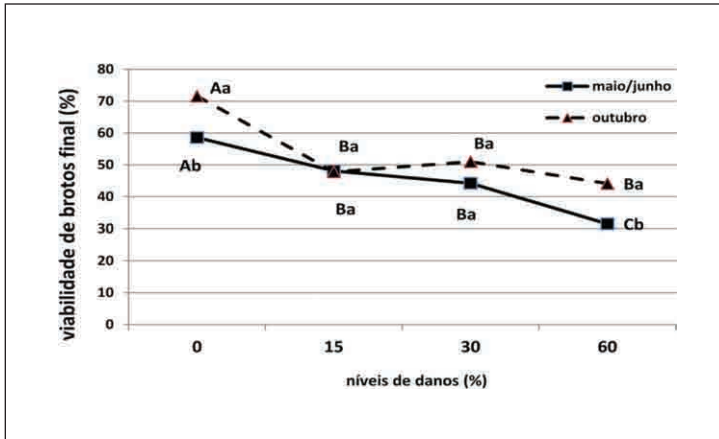


Gráfico 12.18 – Interação entre níveis de danos e épocas de colheita para viabilidade de brotos de leveduras no final da fermentação, na safra 2007/2008. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de níveis de danos.

Fonte: Ravaneli et al., 2011

De maneira geral, os maiores índices de viabilidade celular e de brotos de leveduras são observados no início da fermentação. A redução no número de células vivas no final do processo está relacionada ao aumento na concentração de metabólitos como etanol,  $\text{CO}_2$  e ácidos e redução na quantidade de açúcar e nutrientes do substrato (Stokes, 1971; Hallsworth, 1998). Considerando-se que as leveduras são reutilizadas em ciclos fermentativos posteriores, é de extrema importância a presença de células e brotos viáveis ao final da fermentação para manter a porcentagem de fermento estável na dorna (Amorim et al., 1996).

Quanto à presença de contaminantes, nas fermentações verificou-se aumento significativo na concentração de bactérias com a elevação dos níveis de dano (Gráfico 12.19), indicando que a qualidade da matéria-prima empregada no processo contribuiu para o incremento da população de contaminantes na fermentação.

As bactérias contaminantes da fermentação alcoólica competem com as leveduras pelo mesmo substrato, consomem açúcares e etanol, produzem ácidos e gomas, diminuindo a viabilidade de leveduras e rendimento do processo (Amorim; Oliveira, 1982). As bactérias lácticas dos gêneros

*Lactobacillus* e *Leuconostoc* são os principais contaminantes da fermentação alcoólica (Narendranath, 2003), sendo que *Lactobacillus* é adaptada às condições de fermentação, enquanto *Leuconostoc* é mais sensível ao etanol e geralmente não persiste por longo período no processo fermentativo (Oliva-Neto; Yokoya, 2001). As bactérias lácticas também são responsáveis pela floculação das leveduras (Yokoya; Oliva-Neto, 1991), levando ao assentamento das leveduras no fundo das dornas, o que dificulta a conversão do açúcar em etanol (Rose et al., 1980, citado por Ludwig et al., 2001).

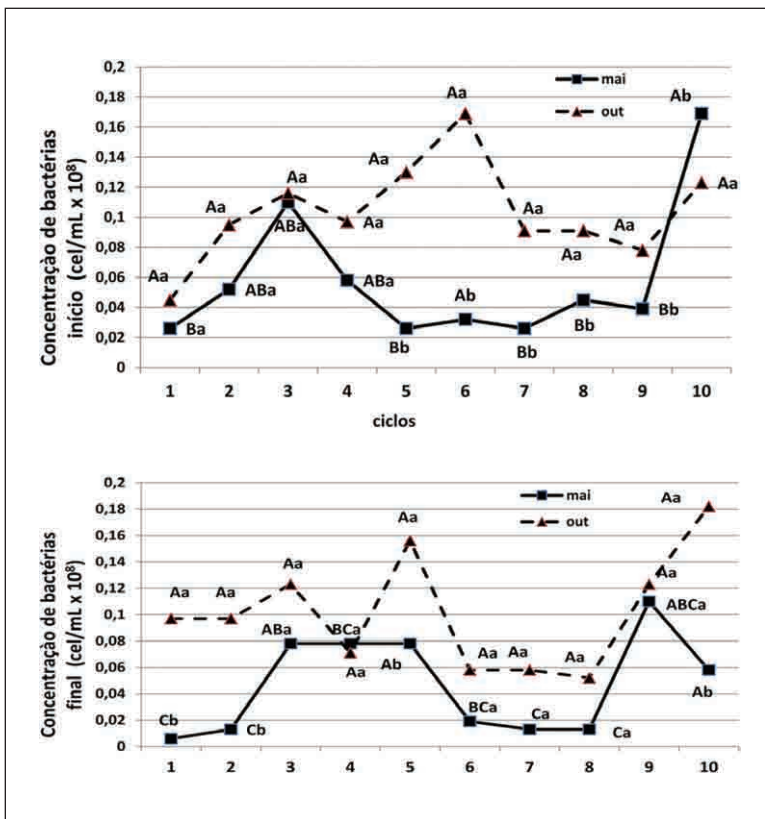


Gráfico 12.19 – Interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para concentração de bactérias contaminantes no início e final da fermentação. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*, safra 2007/2008.

Fonte: Ravaneli et al., 2011

## Avaliação do vinho

O aumento da população de bactérias contaminantes ao final da fermentação resultou em redução no pH dos vinhos (Gráfico 12.20). Constatou-se também aumento dos Açúcares Redutores Residuais Totais nos vinhos, quando houve maior comprometimento dos colmos pelo ataque da praga (Gráfico 12.21), em virtude de a matéria-prima empregada apresentar elevada acidez e maiores teores de compostos fenólicos. Ravaneli (2005) verificou interferência destes compostos sobre o metabolismo das leveduras, com reduções de 7,2% no teor alcoólico dos vinhos quando o nível de infestação da cigarrinha-das-raízes era superior a 2,5 ninfas/m. De acordo com Narendranath et al. (2001) e Polakovic et al. (1992), os compostos fenólicos atuam como inibidores do metabolismo das leveduras, comprometendo o processo de degradação dos açúcares e produção de etanol, aumentando o tempo de fermentação, reduzindo o consumo de açúcares do mosto.

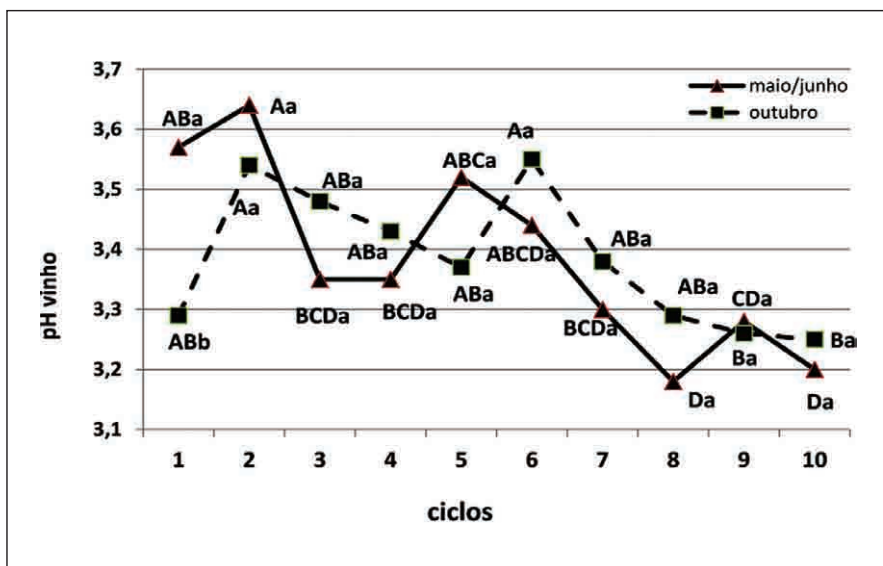


Gráfico 12.20 – Interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para pH dos vinhos. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*, safra 2007/2008.

Fonte: Ravaneli et al., 2011

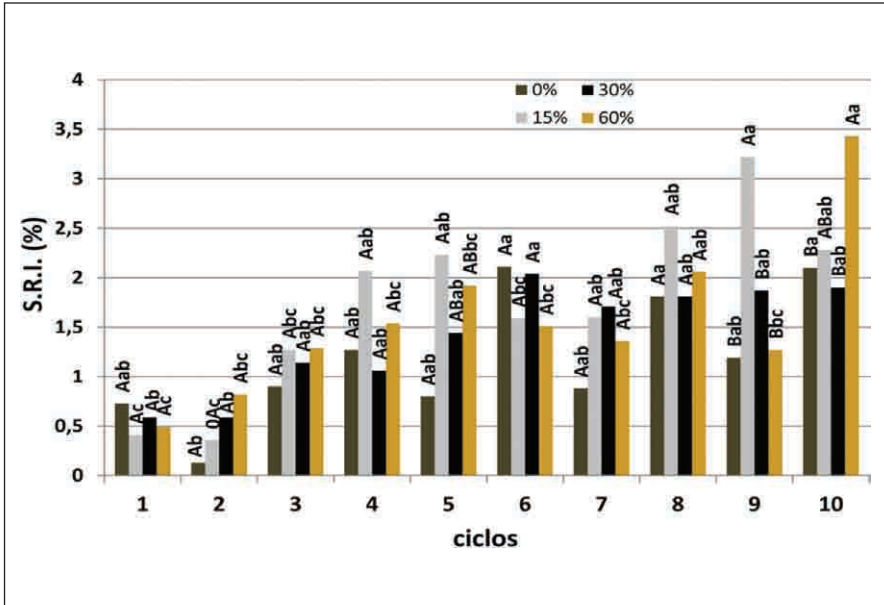


Gráfico 12.21 – Interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para açúcares reductores residuais totais. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*, safra 2007/2008. Fonte: Ravelani et al., 2011

Neste contexto, os resultados obtidos por Ravelani (2010) para teor alcoólico e eficiência fermentativa (Gráfico 12.22) indicam reduções de 13,82% no teor alcoólico dos vinhos e 8,4% na eficiência da fermentação quando colmos com 60% de danos causados pelo ataque de cigarrinha-das-raízes foram utilizados. Verificou-se ainda que as reduções foram maiores ao longo dos ciclos fermentativos, utilizando-se da mesma matéria-prima, sobretudo nos tratamentos com maior porcentagem de danos (Gráficos 12.23, 12.24 e 12.25). Resultados semelhantes foram relatados por Gonçalves (2003), destacando que menores danos na matéria-prima proporcionam maiores teores de açúcares, melhorando a eficiência fermentativa.

As fermentações realizadas no início da safra apresentaram menor teor alcoólico do vinho, embora com maior eficiência da fermentação (Gráfico 12.22). Nessa época, os colmos foram caracterizados com danos menos evi-

denciados, menores níveis de contaminantes e maiores níveis de leveduras selvagens e teores de compostos fenólicos. Sob estas condições o mosto obtido continha os constituintes necessários, possibilitando que as leveduras metabolizassem maior quantidade de açúcar para produzir etanol.

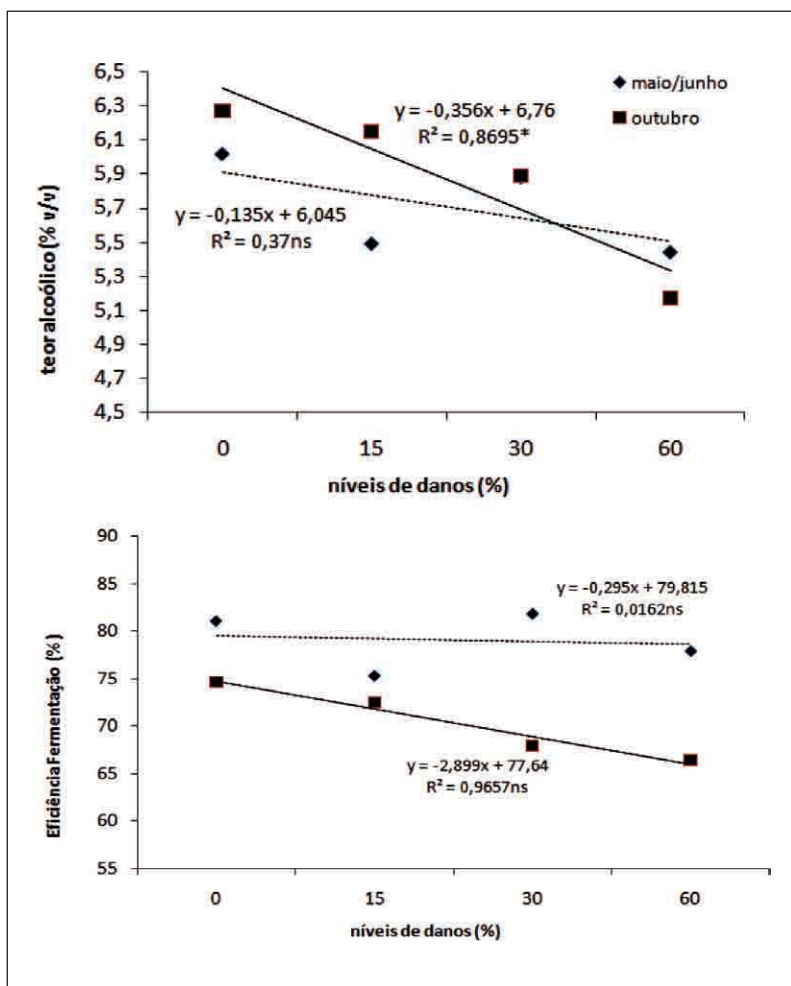


Gráfico 12.22 – Efeito dos danos causados por *M. fimbriolata* sobre teor alcoólico dos vinhos e eficiência da fermentação nas duas épocas de colheita, safra 2007/2008. Os resultados correspondem às médias dos dez ciclos fermentativos.

Fonte: Ravelani et al., 2011

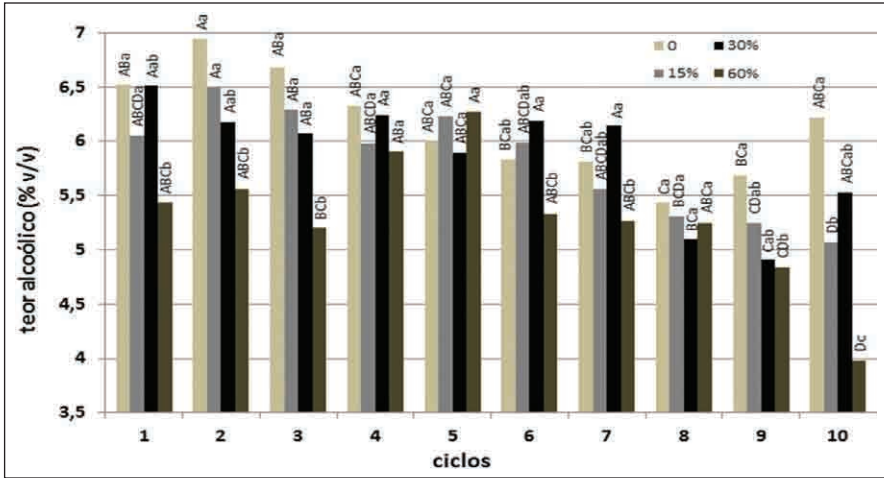


Gráfico 12.23 – Interação entre níveis de danos e ciclos fermentativos para teor alcoólico dos vinhos. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de ciclos fermentativos. Letras minúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de níveis de danos. Os resultados correspondem às médias dos quatro níveis de danos causados pela *M. fimbriolata*, safra 2007/2008.

Fonte: Ravaneli, 2010

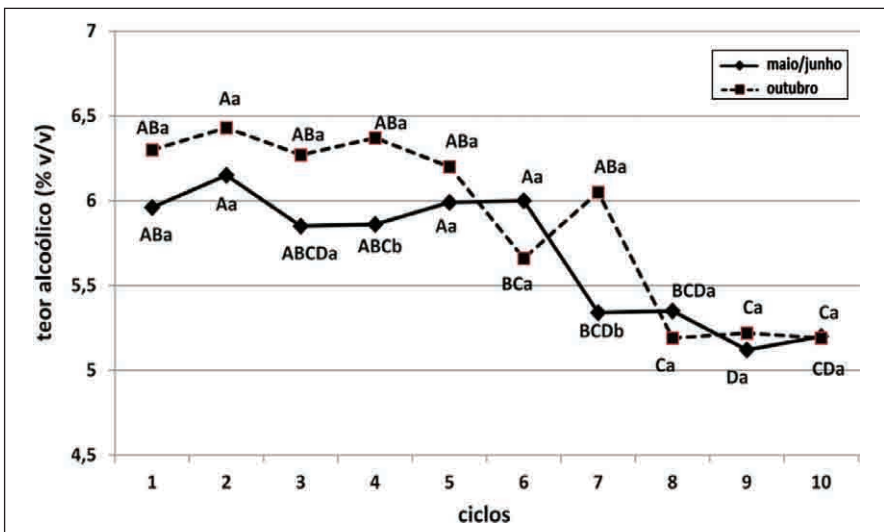


Gráfico 12.24 – Interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para teor alcoólico dos vinhos, safra 2007/2008. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos.

Fonte: Ravaneli, 2010



Considerando-se a realização de ciclos fermentativos, as duas épocas apresentaram comportamento semelhante (Gráfico 12.25), reduzindo os teores alcoólicos à medida que se reutilizou o fermento e mosto proveniente de matéria-prima danificada. Para a colheita realizada em final de safra, o teor alcoólico do vinho foi maior e a eficiência da fermentação foi menor, confirmando que o comprometimento da matéria-prima favoreceu a inibição das leveduras, que apesar de terem apresentado maior viabilidade nessa época, não foram capazes de metabolizar parte dos açúcares para produzir álcool.

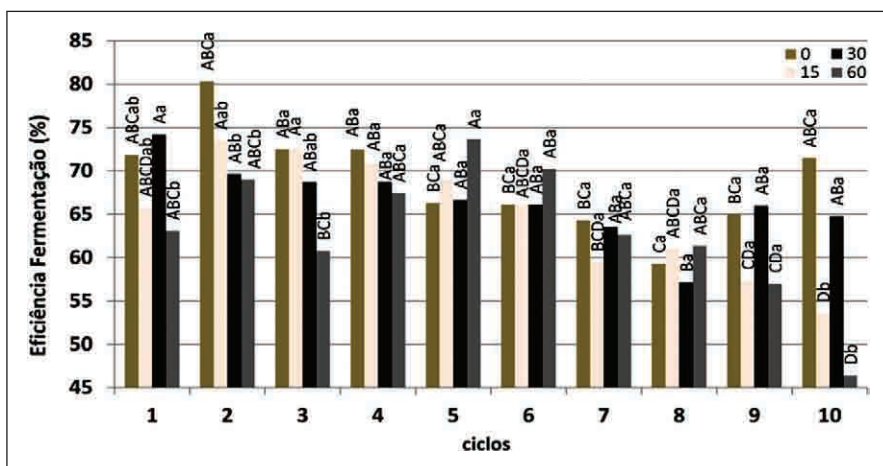


Gráfico 12.25 – Interação entre níveis de danos e ciclos fermentativos para eficiência da fermentação. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de ciclos fermentativos. Letras minúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de níveis de danos. Os resultados correspondem às médias das duas épocas de colheita, safra 2007/2008.

Fonte: Ravaneli, 2010

Nem todo açúcar presente no mosto é transformado em álcool e gás carbônico. Parte é utilizada para a multiplicação do fermento na dorna, bem como para a formação de carboidratos como a trealose e produtos secundários, como glicerol, ácidos, aldeídos, ésteres, álcoois superiores, dentre outros (Amorim, 2005).

Segundo Yokoya (1995), a formação de álcoois superiores é maior quando o fermento apresenta atividade fraca, ocasionando demora no processo fermentativo. Os resultados obtidos por Ravaneli (2010) indicam que

não houve alterações nas concentrações de acetaldeído, álcool isobutílico e isoamílico nos destilados (Gráficos 12.26, 12.27 e 12.28, respectivamente). Considerando-se a formação dos álcoois superiores, este comportamento pode ser decorrente do processo de clarificação do caldo, pela remoção dos aminoácidos, precursores desses compostos.

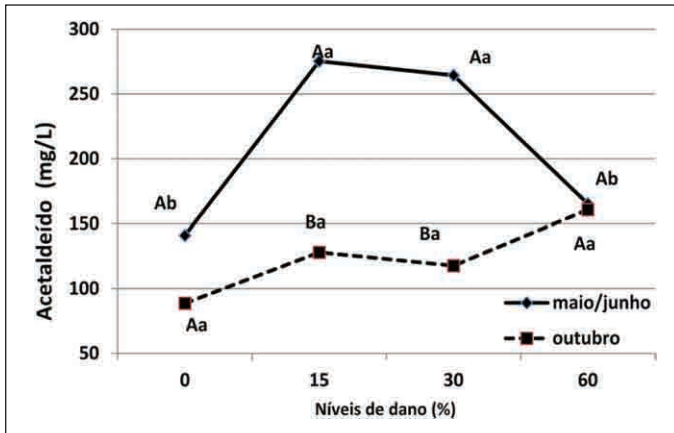


Gráfico 12.26 – Interação entre níveis de danos e épocas de colheita para acetaldeído nos destilados, safra 2007/2008. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de níveis de danos.

Fonte: Ravaneli, 2010

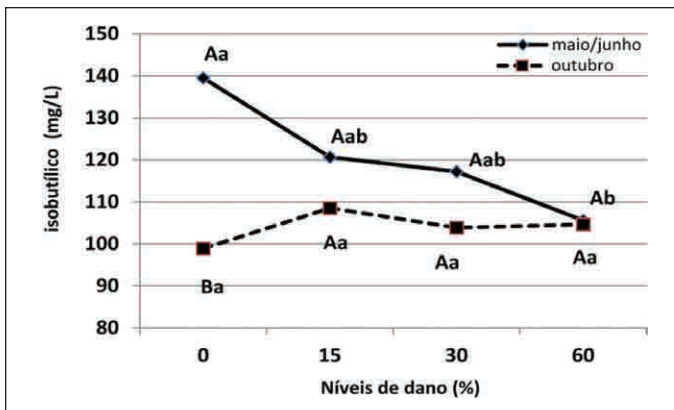


Gráfico 12.27 – Interação entre níveis de danos e épocas de colheita para álcool isobutílico nos destilados, safra 2007/2008. Letras maiúsculas comparam níveis de danos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de níveis de danos.

Fonte: Ravaneli, 2010

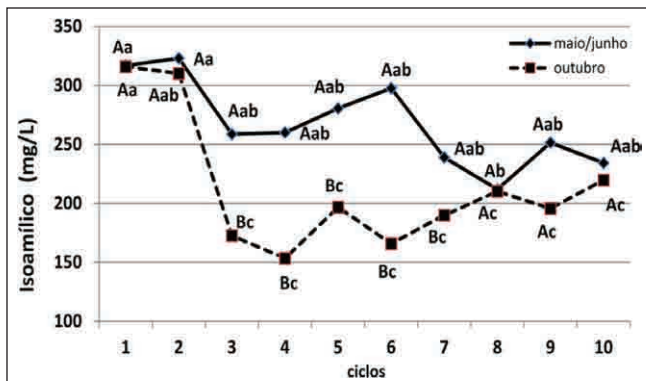


Gráfico 12.28 – Interação entre ciclos fermentativos e épocas de colheita para álcool isoamílico nos destilados, safra 2007/2008. Letras maiúsculas comparam ciclos fermentativos dentro de épocas. Letras minúsculas comparam épocas dentro de ciclos fermentativos.

Fonte: Ravaneli, 2010

Quanto aos compostos secundários formados durante a fermentação, o glicerol é o mais abundante. Sua formação é decorrente da competição pela utilização do poder redutor do NADH na via de obtenção do etanol, sendo inversamente proporcional a sua produção (Amorim et al., 1996). A produção de glicerol está relacionada ao tipo de levedura utilizada e ao ambiente de fermentação (Amorim, 2005).

Resultados obtidos por Garcia (2009) não evidenciaram diferenças significativas para produção de glicerol em relação aos níveis de danos, da mesma forma, para os ciclos fermentativos (Gráfico 12.29).

Nas leveduras do gênero *Saccharomyces*, a trealose é acumulada durante períodos de crescimento reduzido como, por exemplo, na falta de nitrogênio, enxofre e fósforo, assim como durante a fase estacionária de crescimento em glicose (Lillie; Pringle, 1980; Françaís et al., 1991).

A trealose é um carboidrato de reserva produzido pelas leveduras principalmente em situações de estresses, garantindo reservas para sobrevivência (Alcarde; Basso, 1997). Quando se analisam os dados em função dos danos, verifica-se que não houve diferenças no acúmulo de trealose em relação aos níveis de comprometimento dos colmos (Gráfico 12.29). Isso sugere que a cigarrinha-das-raízes não induz a levedura a acumular trealose, mas observando-se os valores obtidos com a análise dos ciclos, nota-se que, ao longo da reutilização destes, a levedura acumula mais trealose tanto no início quanto no final da fermentação (Gráfico 12.30).

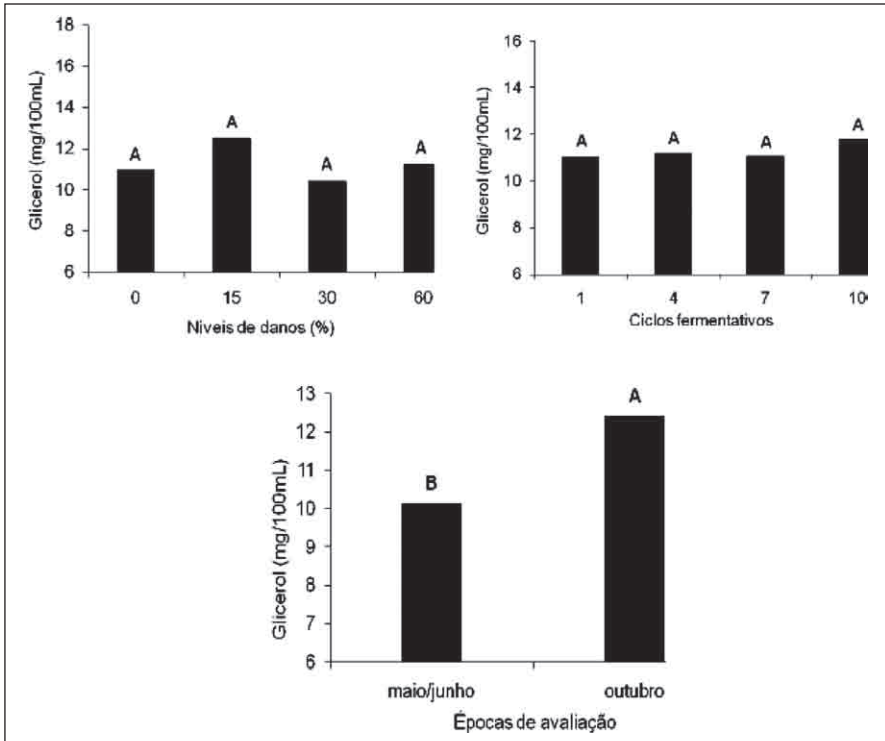


Gráfico 12.29 – Teores de glicerol nos vinhos: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas, safra 2007/2008. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Fonte: Garcia, 2009

O estresse causado pela reciclagem do fermento juntamente com os compostos e metabólitos liberados pelos processos promovem o acúmulo deste carboidrato na célula de levedura. Com relação a épocas, somente se observou resultado significativo no início da fermentação na qual a primeira época de avaliação apresentou maior quantidade de trealose acumulada. Ao final do processo fermentativo observou-se que a quantidade de trealose era menor, pois o meio no qual se encontra a levedura está pobre em substratos, principalmente os açúcares, então esta mobiliza suas reservas (trealose) iniciando a degradação do carboidrato de reserva. Esta degradação é tão maior quanto maior for a temperatura e o teor alcoólico do meio (Amorim et al., 1996). Estudos avaliando a fermentação endógena de *S. cerevisiae* demonstraram a redução nos valores de trealose quando a levedura foi exposta a meio com altos teores alcoólicos e temperaturas elevadas (Ferreira et al., 1999).

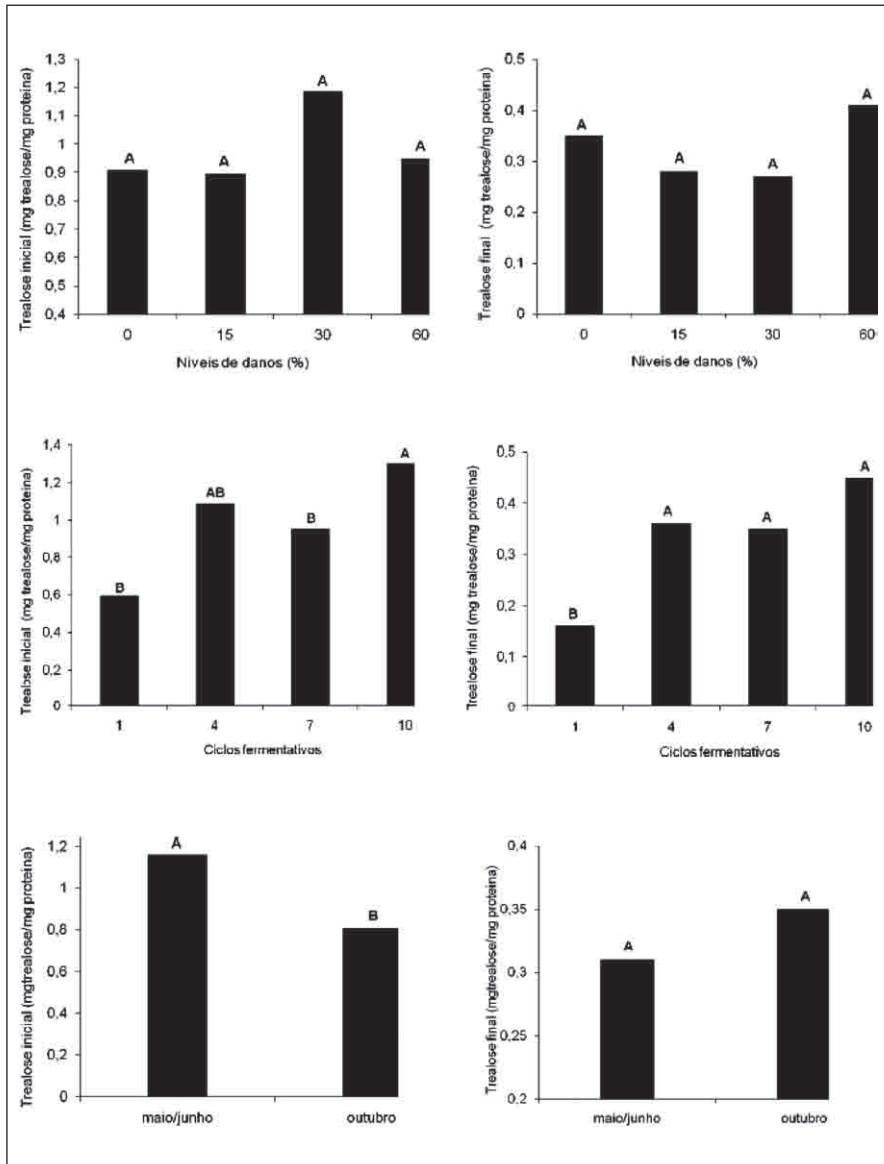


Gráfico 12.30 – Valores de trealose no início e final da fermentação: níveis de danos, ciclos fermentativos e épocas, safra 2007/2008. Médias iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

Fonte: Garcia, 2009

A presença de contaminantes na matéria-prima prejudica o processo fermentativo pelo consumo de açúcares e nutrientes presentes no meio, liberando compostos. Este fato pode estar relacionado com o acúmulo de trealose pela levedura em função do estresse causado.

## Identificação de genes relacionados à resistência varietal

O ataque de cigarrinha-das-raízes reduz a produtividade de colmos e a qualidade da cana, entretanto poucas pesquisas têm sido dedicadas à interação praga-cana-de-açúcar, além da resistência varietal de cana-de-açúcar às cigarrinhas. Diversos estudos abordaram os controles químico (Dinardo-Miranda et al., 2000b; 2001a; 2001b; 2002; 2006a), biológico (idem, 2000b; Garcia et al., 2006) e cultural (idem, 2000b).

Guimarães (2007) avaliou a resistência varietal da cana-de-açúcar à *M. fimbriolata* em três genótipos, dois dos quais já relatados como suscetíveis (Dinardo-Miranda et al., 1999; Dinardo-Miranda, 2004; Silva et al., 2005), e um que tem apresentado baixos níveis de infestação no campo (Dinardo-Miranda, 2003). Além disso, comparou-se os perfis de expressão gênica de genótipos de cana-de-açúcar com diferentes reações à *M. fimbriolata* por meio de um experimento de cDNA-AFLP. A identificação de genes envolvidos na interação da cana-de-açúcar com a cigarrinha-das-raízes pode permitir a caracterização de mecanismos de defesa que seriam úteis ao desenvolvimento de novas estratégias de controle e ao melhoramento genético da cultura.

A duração da fase ninfal (Gráfico 12.31A) foi significativamente maior para a variedade SP83-5073. A literatura evidencia que a duração da fase ninfal ou adulta é maior em genótipos resistentes, possivelmente por mecanismos de antibiose ou deterrência alimentar (Boiça Jr. et al., 1999; Gervásio et al., 1999; Caetano; Boiça Jr., 2000; Suinaga et al., 2004). Os resultados da taxa de mortalidade das ninfas (Gráfico 12.31B) reforçam essa hipótese, uma vez que a variedade SP83-5073 apresentou médias significativamente maiores.

Diversas substâncias tóxicas ou que causam deterrência alimentar, tais como inibidores de proteinase, compostos fenólicos e terpenos estão envolvidos nos mecanismos de defesa das plantas. Alguns desses compostos são constitutivos, enquanto outros necessitam de estímulos externos para serem produzidos (Buchanan et al., 2000).

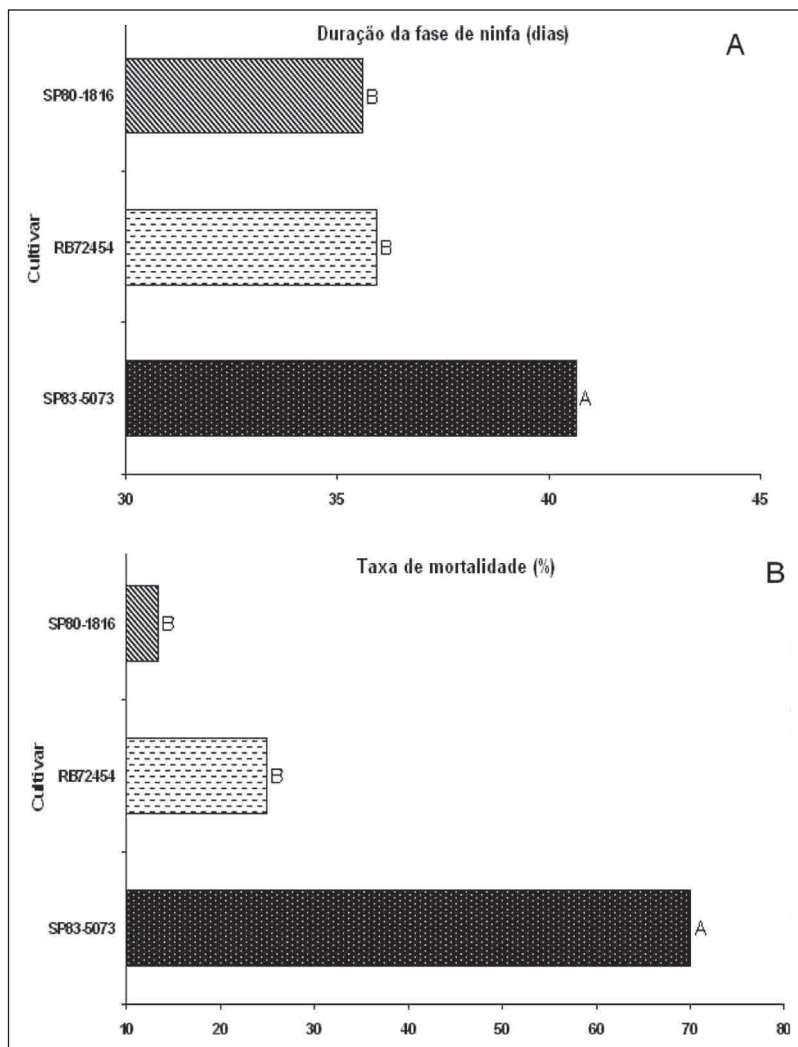


Gráfico 12.31 – Taxa de mortalidade de ninfas e duração da fase ninfal em três variedades. Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Guimarães, 2007

França et al. (2001) identificaram genes relacionados ao metabolismo secundário na cana-de-açúcar e o padrão de expressão de enzimas regulatórias. Relataram que as vias de metabolismo de isopropanoídes e fenilpropanoídes foram ativadas em diferentes estágios de desenvolvimento, tecidos e situações de estresse.

As principais vias envolvidas na síntese de compostos de defesa são a do ácido chiquímico, responsável pela produção de compostos fenólicos e indiretamente pela produção de compostos secundários nitrogenados, a do ácido mevalônico, produtora de alguns compostos fenólicos e terpenos, e a do metil-D-eritritol 4-P (MEP), produtora de terpenos (Taiz; Zeiger, 2004).

A infestação de cigarrinhas afetou a massa seca e fresca de colmos, o diâmetro e altura de colmos (Tabelas 12.5 e 12.6; Gráficos 12.32C e 12.32D). Este resultado corrobora trabalhos anteriores (Dinardo-Miranda et al., 1999; Dinardo-Miranda et al., 2002; De La Cruz Llanas et al., 2005; Dinardo-Miranda et al., 2006a) que relatam perdas significativas de produtividade de colmos em cana-de-açúcar atacada por cigarrinhas. As ninfas de cigarrinha-das-raízes alimentam-se principalmente de seiva do xilema, o que possivelmente resulta em deficiência hídrica e de nutrientes e conseqüentemente, em distúrbios metabólicos generalizados (Fewkes, 1969; Gallo et al., 2002; Dinardo-Miranda et al., 2004). Além disso, sob déficit hídrico, a taxa fotossintética é reduzida dramaticamente, comprometendo o crescimento e desenvolvimento da planta (Taiz; Zeiger, 2004). Com a infestação, as plantas secam e morrem (Gallo et al., 2002).

A análise de crescimento demonstrou diferenças varietais. As menores médias para massa fresca e altura de colmos foram encontrados na variedade RB72454 e colmos mais finos foram encontrados na variedade SP80-1816.

Todos os parâmetros de crescimento apresentaram aumento ao longo do tempo, que é uma consequência do crescimento das plantas. Não foi detectada variação no diâmetro de colmos ao longo das épocas, provavelmente porque a primeira coleta foi realizada quando as plantas já tinham quase 100 dias de idade. Embora não haja interação significativa entre a infestação de *M. fimbriolata* e as épocas de coleta, a redução na massa fresca e seca de folhas aos 68 DAI pode ser por causa do estresse hídrico causado pela alimentação das ninfas, limitando a taxa fotossintética.

As menores médias de massa fresca e seca de raízes observadas na variedade SP83-5073 (Tabelas 12.5 e 12.6) provavelmente não estão envolvidas na maior duração da fase ninfal e taxa de mortalidade nessa variedade, uma vez que, no momento da infestação, quando a massa fresca de raízes era em média 114 g, as ninfas foram capazes de alimentar-se e desenvolver-se.



Silva et al. (2005) demonstraram que as ninfas foram capazes de desenvolver-se normalmente e produzir fortes sintomas em plantas mais jovens, as quais provavelmente possuíam menor massa de raízes. Entretanto, a existência de diferenças morfológicas nessa variedade que possa afetar a alimentação de *M. fimbriolata* não pode ser descartada. Apesar das evidências de mecanismos de antibiose da SP83-5073 contra a cigarrinha-das-raízes, pode existir uma combinação com a morfologia das raízes que reforça a resistência.

Tabela 12.5 – Teste de Tukey para massa fresca (g) de colmos, folhas e raízes e diâmetro de colmos (mm)

	Causas da variação	Massa fresca (g)			Diâmetro de colmos (mm)
		Colmos	Folhas	Raízes	
Variedades (V)	1. SP80-1816	111,50 AB	58,53 A	191,37 A	15,64 B
	2. RB72454	103,40 B	63,32 A	189,85 A	15,85 AB
	3. SP83-5073	122,53 A	61,60 A	145,27 B	16,95 A
	Teste F (V)	5,89**	1,57 <sup>ns</sup>	7,16**	4,11*
	DMS Tukey 5%	13,53	6,64	33,47	1,18
Níveis de infestação (I)	1. Testemunha	122,53 A	62,31 A	165,89 A	16,82 A
	2. 10 ninfas por planta	102,42 B	59,98 A	185,11 A	15,48 B
	Teste F (I)	19,40**	1,08 <sup>ns</sup>	2,89 <sup>ns</sup>	11,25**
	DMS Tukey 5%	9,19	4,50	22,73	0,80
Épocas de amostragem (E)	1. 8 DAI	51,37 C	58,24 BC	113,92 C	16,50 A
	2. 17 DAI	111,30 B	69,44 A	124,60 C	16,45 A
	3. 39 DAI	138,43 A	62,93 AB	176,99 B	15,60 A
	4. 68 DAI	148,80 A	53,98 C	286,48 A	16,03 A
	Teste F (E)	91,57**	8,75**	48,81**	1,13 <sup>ns</sup>
	DMS Tukey 5%	17,19	8,43	42,55	1,50
	V x I	4,27*	1,37 <sup>ns</sup>	0,69 <sup>ns</sup>	1,67 <sup>ns</sup>
	V x E	6,31**	0,81 <sup>ns</sup>	1,16 <sup>ns</sup>	2,69*
	I x E	13,09**	1,15 <sup>ns</sup>	0,35 <sup>ns</sup>	5,69**
	V x I x E	4,25**	0,25 <sup>ns</sup>	1,06 <sup>ns</sup>	1,08 <sup>ns</sup>
CV %	17,23	15,55	27,32	10,50	

DAI = Dias após a infestação; Letras maiúsculas comparam medias verticalmente pelo teste de Tukey; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; ns = não significativo.

Fonte: Guimarães, 2007

Tabela 12.6 – Resultado e teste de Tukey para massa seca (g) de colmos, folhas e raízes e altura de colmos (cm)

	Causas de variação	Massa seca (g)			Altura de Colmos (cm)
		Colmos	Folhas	Raízes	
Variedades (V)	1. SP80-1816	12,83 A	14,35 A	47,61 A	69,31 A
	2. RB72454	14,06 A	15,96 A	47,30 A	63,11 B
	3. SP83-5073	12,67 A	14,47 A	33,75 B	73,33 A
	Teste F (V)	0,95 <sup>ns</sup>	1,62 <sup>ns</sup>	6,42 <sup>**</sup>	9,99 <sup>**</sup>
	DMS Tukey 5%	2,66	2,41	10,68	5,57
Níveis de infestação (I)	1. testemunha	14,66 A	16,11 A	41,47 A	71,81 A
	2. 10 ninfas por planta	11,71 B	13,74 B	44,30 A	65,35 B
	Teste F (I)	10,84 <sup>**</sup>	8,51 <sup>**</sup>	0,61 <sup>ns</sup>	11,83 <sup>**</sup>
	DMS Tukey 5%	1,80	1,63	7,25	3,78
Épocas de amostragem (E)	1. 8 DAI	5,87 C	15,96 A	40,55 B	58,15 C
	2. 17 DAI	12,60 B	17,07 A	40,04 B	63,94 BC
	3. 39 DAI	14,39 B	15,20 A	39,76 B	67,64 B
	4. 68 DAI	19,89A	11,48 B	67,19 A	84,61 A
	Teste (E)	41,54 <sup>**</sup>	8,88 <sup>**</sup>	24,87 <sup>**</sup>	36,60 <sup>**</sup>
	DMS Tukey 5%	3,38	3,06	13,57	7,07
	V x I	3,08 <sup>ns</sup>	3,62 <sup>*</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	1,43 <sup>ns</sup>
	V x E	1,29 <sup>ns</sup>	1,42 <sup>ns</sup>	1,99 <sup>ns</sup>	5,38 <sup>**</sup>
	I x E	4,03 <sup>*</sup>	0,57 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>ns</sup>	6,71 <sup>**</sup>
	V x I x E	1,48 <sup>ns</sup>	0,91 <sup>ns</sup>	0,73 <sup>ns</sup>	3,19 <sup>*</sup>
CV (%)	28,86	23,10	35,66	11,63	

DAI = Dias após a infestação; Letras maiúsculas comparam medias verticalmente pelo teste de Tukey; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; ns = não significativo.

Fonte: Guimarães, 2007

A menor massa fresca de colmos das variedades SP80-1816 e RB72454 pode ser decorrente do ataque da praga (Figura 12.37A), uma vez que essas variedades já foram relatadas como suscetíveis (Dinardo-Miranda et al., 1999; Dinardo-Miranda, 2004; Silva et al., 2005). O Gráfico 12.32A também indica que o ataque de *M. fimbriolata* não teve efeito sobre a massa fresca de colmos na variedade SP83-5073, corroborando os indícios de resistência fornecidos pela mortalidade de ninfas e duração da fase ninfal (Gráfico 12.30).

Dinardo-Miranda (2004) relata que, em condições de campo, a variedade RB72454 apresenta menor infestação que a SP80-1816. Essa menor infestação pode ser devida a não preferência da cigarrinha por esse genó-

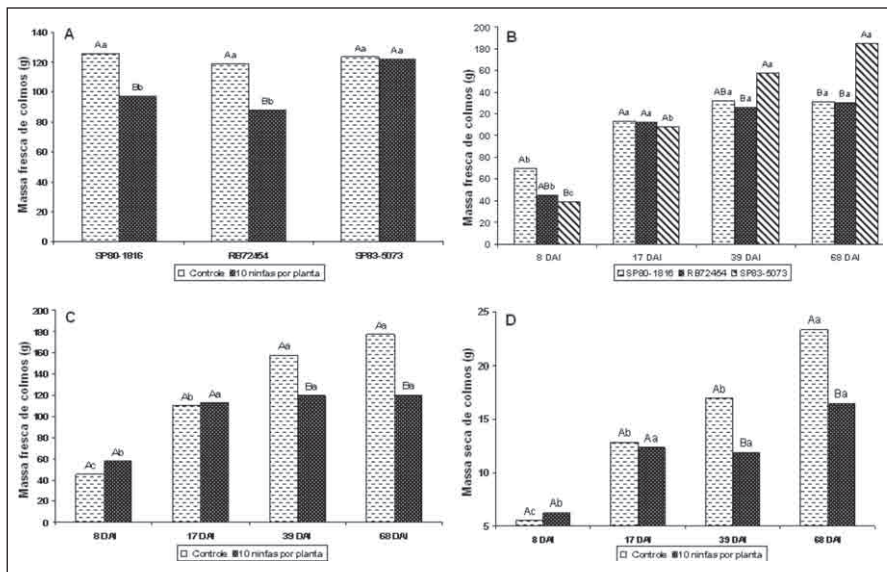


Gráfico 12.32 – Massa fresca e seca de colmos. A – Efeito dos níveis de infestação dentro de variedades; B – Efeito de variedades dentro das épocas; C, D – Efeito dos níveis de infestação dentro das épocas. Médias seguidas por diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam medias dentro dos tratamentos e letras minúsculas comparam médias dentro de tratamentos.

Fonte: Guimarães, 2007

tipo. Experimentos com chance de escolha são necessários para confirmar essa hipótese.

O Gráfico 12.32B mostra que a massa fresca da variedade SP83-5073 superou as demais ao longo do tempo quando submetida à infestação de *M. fimbriolata*, o que pode ser resultado de mecanismos de antibiose ou morfologia de raízes, que inibiram a alimentação e crescimento das ninfas.

Houve uma tendência de diminuição da altura e diâmetro de colmos na SP80-1816 e RB72454 ao longo do tempo, provavelmente por causa da infestação de *M. fimbriolata*, enquanto o oposto foi observado para a SP83-5073 (Gráficos 12.33A e 12.33B), o que também caracteriza que essa variedade é resistente à cigarrinha-das-raízes.

Ao longo do tempo, a altura e diâmetro de colmos foram significativamente afetados pela praga, corroborando com os sintomas de desidratação, colmos finos e “chochos” e morte da planta descritos por Macedo e Macedo (2004) e Gallo et al. (2002).

Guimarães (2007) utilizou cDNA-AFLP (Bachen et al., 1998), para estudar a expressão gênica diferencial por sua simplicidade e custo relativamente baixo, se comparada a microarranjos de cDNA. Das 64 combinações possíveis de iniciadores, utilizaram-se oito que apresentavam maior polimorfismo para cana-de-açúcar em ensaios anteriores, das quais quatro foram escolhidas (Tabela 12.7).

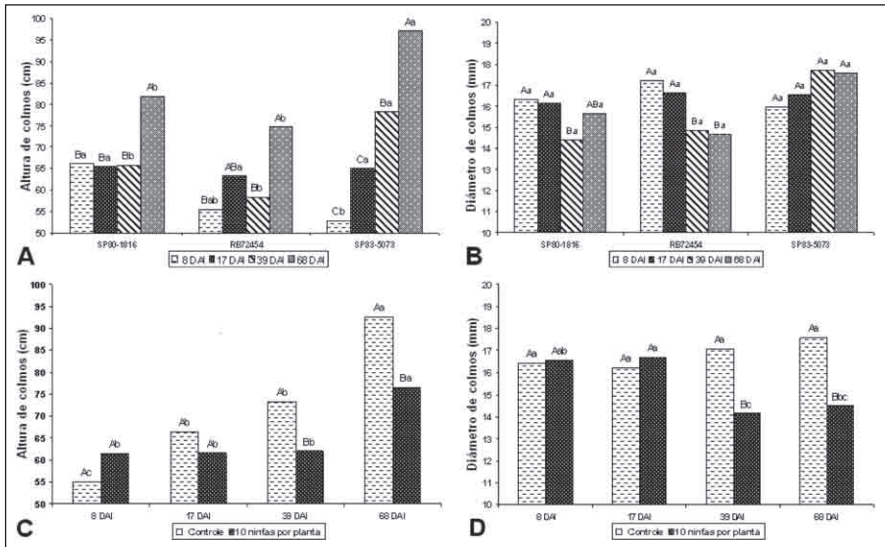


Gráfico 12.33 – Altura e diâmetro de colmos. A, B – Efeito da época dentro de variedades; C, D – efeito dos níveis de infestação dentro de épocas. Letras maiúsculas comparam médias dentro dos tratamentos e letras minúsculas comparam médias entre os tratamentos.

Fonte: Guimarães, 2007

Tabela 12.7 – Combinações de iniciadores selecionadas (LI-COR)

Combinação	Iniciador MseI	Iniciador marcado IRDye (TaqI)
I	GAT GAG TCC TGA GTA ACA	GAT GAG TCC TGA CCG AGA
II	GAT GAG TCC TGA GTA ACT	GAT GAG TCC TGA CCG AGA
III	GAT GAG TCC TGA GTA AAC	GAT GAG TCC TGA CCG AGT
IV	GAT GAG TCC TGA GTA AAG	GAT GAG TCC TGA CCG AGT

Fonte: Guimarães, 2007

Poucos fragmentos diferencialmente expressos foram observados, mas, na Figura 12.6, podem ser observadas bandas de aproximadamente 389 pb que foram expressas no genótipo resistente (combinação de iniciadores I) quando submetido à infestação de cigarrinha (poços 5 e 6, setas vermelhas).

Essas bandas foram expressas somente na variedade SP83-5073, 24 e 48 horas após a infestação, o que indica que esses fragmentos podem estar envolvidos em mecanismos de defesa do genótipo resistente. Uma vez que foram expressos pouco tempo após a infestação, é possível que esses fragmentos codifiquem proteínas relacionadas à patogênese. Essas proteínas estão relacionadas com mecanismos de interação planta-praga, e muitas vezes produzem resposta de defesa na planta hospedeira.

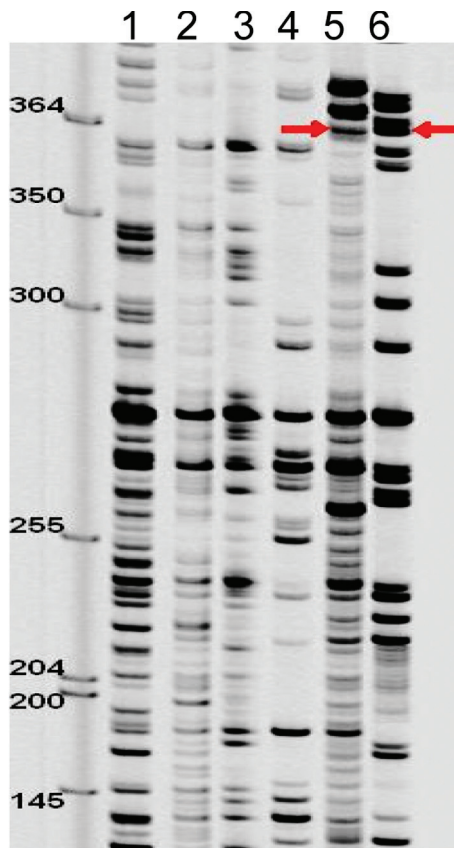


Figura 12.6 – Foto do gel de cDNA-AFLP (combinação de iniciadores “I”) mostrando fragmentos (setas vermelhas) de 389 pb que foram diferencialmente expressos na variedade SP83-5073 atacada pela cigarrinha-das-raízes aos 24 e 48 horas após a infestação.

Descrição: 1 – SP80-1816 antes da infestação; 2 – SP80-1816 1 dia após a infestação (testemunha); 3 – SP80-1816 1 dia após a infestação (infestada); 4 – SP83-5073 antes da infestação; 5 – SP83-5073 1 dia após a infestação (infestada); 6 – SP83-5073 2 dias após a infestação (infestada).

Fonte: Guimarães, 2007

Parece improvável que o fragmento de aproximadamente 389 pb identificado neste experimento seja um falso positivo, uma vez que duas plantas foram utilizadas para cada condição, e cada reação foi corrida ao menos oito vezes para confirmar a expressão. Entretanto, outros estudos são necessários para confirmar/validar este resultado.

Em função dos fortes indícios de resistência observados na análise de crescimento, mortalidade do inseto e longevidade de ninfas, há a possibilidade de que este fragmento possa de fato estar envolvido com a resistência genética, ainda que outros mecanismos possam estar envolvidos na resistência como, por exemplo, a morfologia das raízes.

A sequência de nucleotídeos do fragmento poderia fornecer alguma informação sobre a provável função da proteína codificada pelo mesmo, visto que foi proveniente de sequência gênica expressa (cDNA). Quando 96 clones recombinantes provenientes da ligação do fragmento isolado do gel de agarose foram clonados e sequenciados, obtiveram-se 93 sequências válidas (de boa qualidade), as quais foram então analisadas por meio do programa phredPhrap após a remoção das sequências do vetor e as sequências Fasta foram clusterizadas pelo programa *crossmatch*. O resultado da clusterização foi a obtenção de 2 Contigs, um com duas sequências e contendo 363 nucleotídeos (Contig1 – Figura 12.7) e outro com 91 sequências e contendo 355 nucleotídeos (Contig2 – Figura 12.8). Após o alinhamento das sequências consenso dos dois Contigs usando o programa Clustalw,<sup>1</sup> verificou-se que os dois Contigs apresentaram homologia total de 71%, sendo que a homologia nas porções 3' e 5' é de 100%, estando a diferença na porção intermediária (Figura 12.9). Portanto, parece tratar-se de duas isoformas, e a do Contig2 é predominante (91 sequências *versus* 2).

Após utilizar a ferramenta Blastn do banco de dados do NCBI e fazer pesquisa contra o banco de sequências EST (dbEST) utilizando-se das sequências apresentadas nas Figuras 12.7 e 12.8, verificou-se que as mesmas apresentam alta homologia com sequências de outras espécies vegetais associadas com mecanismos de defesa e associação simbiótica.

O primeiro “hit” (e-28) foi com uma sequência de cDNA encontrada em uma cultivar de soja, Sinpaldalkong 2, e que estaria relacionado com a via de transdução de sinais relacionada à simbiose de plantas de soja com

---

1 Ver: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>>

```

CactacTataggGCGAATTGGGCCCTCTattcgATGCTCGAGCG
GCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGAT
GAGTCCTGACCGAGAGGAACACTAATAGCGAACACCACAC
GGTCATATTGATCGTATACCACGCACTACGTACAGCATGCC
AATAATAGAACAATGACATATAGCGCTGCCAATAACTAC
TACTAGTTGCTGTAGTACTTGGGTGCCGCGCTGCTGATCT
GCGACTGCATACGTATGGCCAAACGTGATTCTGTAATTCTG
CAGCATCGCTGTTACTCAGGACTCATCTGGACTCATCTGTT
ACTCAGGACTCATCAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGG
CCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTAC

```

Figura 12.7 – Sequência Fasta consenso do Contig1, o qual é composto por 2 sequências. A sequência sombreada em amarelo foi utilizada nas análises feitas com a ferramenta Blast do NCBI. As letras minúsculas representam bases sem qualidade.

Fonte: Guimarães, 2007

```

caCtccTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAtaCGCATGCTCGA
GCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTT
GATGAGTCCTGAGTAACAGTGATGAGTCCTGAGTAACAGC
GATGCTGCAGAATTACAGAATCACGTTTGGCCATACGTATG
CAGTCGCAGATCAGCAGCGCGGCATCCAAGTACTACAGCA
ACTAGTAGTAGTATTATTGGCAGCGCTATATGTCATTGTTT
TATTATTGACATGCTGTACGTAGTGCGTGGTATACGATCAA
TATGACCGTGTGGTGTTCGCTATTAGTGTTCCTCTCGGTCA
GGACTCATCAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTT
ACTAGTGGATCCGAGCTCGGTAC

```

Figura 12.8 – Sequência Fasta consenso do Contig2, o qual é composto por 91 sequências. A sequência sombreada em amarelo foi utilizada nas análises feitas com a ferramenta Blast do NCBI. As letras minúsculas representam bases sem qualidade.

Fonte: Guimarães, 2007

bactérias do gênero *Rhizobium* nas raízes (Lestari et al., 2006). É possível que, na presente pesquisa, o fragmento encontrado tenha algum papel na interação da cana-de-açúcar com a cigarrinha-das-raízes, talvez no reconhecimento da praga pela planta.

O segundo “hit” (e-27) foi uma sequência de cDNA encontrada em plantas de arroz submetidas a estresse por frio. Apesar de o trabalho ainda não ter sido publicado, os responsáveis pelo depósito da sequência (Morsy

```

Contig1_2-reads_      CACTACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTATTTCGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATG 60
Contig2_91-reads_    CACTCTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTATACGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATG 60
*****

Contig1_2-reads_      GATATCTGCAGAAITCGCCCTTGATGAGTCTCGACCAGAGGAACACTAATAGCGAACAC 120
Contig2_91-reads_    GATATCTGCAGAAITCGCCCTTGATGAGTCTCGAGTAACAGTGTGATG--AGTCTGAGTAA 118
*****

Contig1_2-reads_      CACACGGTCATATTGA-TCGTATA-CCACGCCTACGTACAGCATGCCAATAATAGAACA 178
Contig2_91-reads_    CA-GCGATGCTGCAGAATTACAGAATCACGTTTGGCCATACGTATGC-AGTCGCAGATCA 176
** ** * * ** * * * ** * * * ** * * * ** *

Contig1_2-reads_      ATGACATATAGCGCTGCCAATAATACTACTACTAGTGTGCTAGTACTTG-GGTGCCGCG 237
Contig2_91-reads_    GCAGCGCG--GCA-TCCAAGTACTACAGCAACTAGTAGTATTATTGGCAGCGCTATA 233
* ** * * * ** * * ** * * ** * * * *

Contig1_2-reads_      CTGCTGATCTGCGACTGCATACGTATGCCAAACGTGATTCTGTAATTCTGCAGCATCGC 297
Contig2_91-reads_    -TGTCATTGTTCTATTATTGACAT---GCTGTACGTAGTGC-GTGGTATACGATCAATAT 288
** * * * * ** * * ** * * ** * * * *

Contig1_2-reads_      TGTACTCAGGACTCATC-TGGACTCATCTGTACTCAGGACTCATCAAGGCGCAATTC 356
Contig2_91-reads_    GACCGTGTGGTGTTCGCTATTAGTGTTCCTCTCGGTCAGGACTCATCAAGGCGCAATTC 348
* ** * ** * * ** * * ** * * ** * * ** *

Contig1_2-reads_      AGCACACTGGCGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTAC 397
Contig2_91-reads_    AGCACACTGGCGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTAC 389
*****

```

Figura 12.9 – Resultado do alinhamento dos Contigs 1 e 2, demonstrando a homologia entre os mesmos. As porções 5' e 3' apresentam a mesma sequência de nucleotídeos.

Fonte: Guimarães, 2007

et al., University of Arkansas) relatam que a sequência é semelhante a uma quitinase da classe III presente em *Sphenostylis stenocarpa*. A quitinase está relacionada à resistência de plantas a pragas e algumas doenças, uma vez que degrada o exoesqueleto de insetos e a quitina produzida por alguns fungos.

Outra sequência que também apresentou alta similaridade com as deste estudo (e-27) está envolvida com a resposta de plantas de nabo à injúria mecânica. Uma análise com a ferramenta Genevestigator indicou que esse fragmento de 228 pb também seria induzido por patógenos e insetos em um fragmento homólogo de *Arabidopsis*. De acordo com os autores da pesquisa (Sarosh; Meijer, 2007), a sequência que corresponde à desse estudo apresentou baixa homologia com outras presentes em bancos de dados.

No trabalho de Sarosh e Meijer (2007), de modo geral os genes de resposta a patógenos foram elicitados em períodos maiores após a injúria mecânica ou infestação da traça. E diversos genes envolvidos em vias de resistência a doenças mostraram ser induzidos também em *Arabidopsis* submetida a ferimentos (Cheong et al., 2002). O aumento na expressão de possíveis me-



canismos de resistência durante a infestação do inseto e injúria mecânica indica a ampla existência de *cross-talk* em diversas formas de estresses bióticos em que ações antagonistas aos ácidos jasmônico e salicílico foram descritas. Além disso, genes induzidos pela infestação de nematoides e afídeos foram identificados entre os ortólogos induzidos por estresses bióticos.

Os resultados do confronto do fragmento encontrado nesse estudo com o banco de dados do NCBI por meio da ferramenta Blastn indicam que a sequência pode estar relacionada com algum mecanismo de defesa. No entanto, foi encontrada alta homologia com fragmentos que foram identificados recentemente e que apresentariam diferentes funções. Será necessário comparar as sequências genômicas de arroz, milho e sorgo e verificar a existência de isoformas/splincing alternativo destas sequências.

Com os resultados obtidos até o momento não é possível afirmar que a sequência identificada está realmente correlacionada com a maior resistência da variedade SP83-5073 à cigarrinha *M. fimbriolata*. Estudos adicionais são necessários para confirmar ou não essa associação.

Além disso, estudos morfológicos são necessários para apontar se a antibiose é o único fator de resistência na variedade SP83-5073, uma vez que pode haver uma combinação com a morfologia das raízes que reforça a resistência.

Os resultados obtidos confirmam a suscetibilidade das variedades SP80-1816 e RB72454 à *M. fimbriolata*, e fornecem fortes indícios de que a variedade SP83-5073 é resistente à praga por meio de um mecanismo de antibiose. A banda diferencialmente expressa na variedade SP83-5073, identificada por cDNA-AFLP, pode estar relacionada com a defesa à cigarrinha-das-raízes. A clonagem e o sequenciamento do DNA presente nesta banda revelou a presença de duas sequências, possivelmente isoformas, que possuem homologia com sequência de cDNAs de outras plantas e que parecem estar relacionadas com mecanismos de defesa contra estresse biótico e abiótico e com associação simbiótica.

## Referências bibliográficas

- ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; SANTOS, A. S. Controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata*, com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. *Stab: açúcar, álcool e subprodutos*, Piracicaba, v.22, n.4, p.42-5, 2004.

- ALMEIDA, L. C.; STINGEL, E.; ARRIGONI, E de B. Monitoramento e controle de pragas da cana-de-açúcar. Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), 2008. 35p.
- ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.54, n.3, p.543-6, 1997.
- AMORIM, H. V. Nutrição mineral da levedura, aspectos teóricos e práticos. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 4, 1985, Piracicaba. *Anais...*, p.44-8.
- AMORIM, H. V., OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. *Álcool e Açúcar*. São Paulo, v.2, n.5, p.12-8, 1982.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. G. *Processos de produção de álcool: controle e monitoramento*. Piracicaba: FERMENTEC/Fealq/ESALQ-USP, 1996, 93p.
- AMORIM, H. V. de. *Fermentação alcoólica, ciência e tecnologia*. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448p.
- ANGELIS, D. F. de. Agentes físicos, químicos e microbiológicos que afetam a fermentação alcoólica. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. *Aguardente de cana: produção e qualidade*. Jaboticabal, Funep, 1992 p.49-66.
- BACHEM, C. W. B.; OOMEN R. J. F. J.; VISSER, R. G. F. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.16, p.157-73, 1998.
- BASSO, L. C. et al. Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica de cariotipagem. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5. Águas de São Pedro, *Anais...*, p.245-50, 1993.
- BEVAN, D.; BOND, J. Microorganism in field and mill – a preliminary survey. In: CONFERENCE OF SOCIETY SUGAR CANE TECHNOLOGY, 38. 1971. *Proceedings...*, p.137-43.
- BI, J. L. et al. Do plant phenolics confer resistance to specialist and generalist insect herbivores? *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.45, p.4500-4, 1997.
- BLUMER, E. *Efeito do complexo broca/podridões na fermentação etanólica*. Piracicaba, 1992. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- BOIÇA JR.; A. L.; LARA, F. M.; OLIVEIRA, J. C. Influence of passion fruit genotypes and larval density on the biology of *Dione juno juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.28, n.1, 1999.
- BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.56, n.1, p.207-15, 1999.
- CAETANO, A. C.; BOIÇA JR., A. L. Development of *Leptoglossus gonagra* Fabr. (Heteroptera: Coreidae) in passion fruit species. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.29, n.2, 2000.

- CHAVES, J. B. P.; PÓVOA, M. E. B. A qualidade da aguardente de cana-de-açúcar. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. *Aguardente de cana: produção e qualidade*. Jaboticabal: Funep, 1992, p.93-132.
- CELESTINE-MYRTIL-MARLIN, A. D. Influence of cane age on sugars and organic acids distribution in sugarcane stalks. *Sugar y Azucar*, Engliword, p.17-24, 1990.
- CHEONG, Y. A et al. Transcriptional profiling reveals novel Interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v.129, n.2, p.661-77, 2002.
- CHEN, J. C. P.; CHOU, C. C. *A manual for cane sugar manufactures and their chemists*. 12.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1993, 1089p.
- COCK, J. H. Sugarcane growth and development. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v.105, n.1259, p.540-52, 2003.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, primeiro levantamento. Brasília: Conab, maio 2011.
- CULY, M. D. Yield loss of field corn from insects. In: PETERSON, R. K. D.; HIGLEY, L. G. (Eds.). *Biotic Stress and Yield Loss*. Boca Raton: CRC Press, 2001, p.43-71.
- DE LA CRUZ-LLANAS, J. J. et al. Una técnica simple para el desarrollo de ninfas de *Aeneolamia postica* (Homoptera: Cercopidae). *Folia Entomológica Mexicana*, v.44, n.1, p.91-3, 2005.
- DINARDO-MIRANDA, L. L. *Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar*. Campinas: Instituto Agrônomo, 2003. 72p.
- . *Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar*. In: SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B. (Ed.). *Pragas de solo no Brasil*. Passo Fundo: Embrapa, 2004. p.495-516.
- . *Pragas*. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, M. G. A. de. *Cana-de-açúcar*. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; FERREIRA, J. M. G.; CARVALHO, P. A. M. Influência da cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata*, sobre a qualidade tecnológica da cana-de-açúcar. *Stab: açúcar, álcool e subprodutos*, Piracicaba, v.19, n.2, p.34-5, 2000a.
- . Influência da época de colheita e do genótipo de cana-de-açúcar sobre a infestação de *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae). *Neotropical Entomology*, Londrina, v.30, n.1, p.145-9, 2001a.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; GARCIA, V.; PARAZZI, V. J. Efeito de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) e de nematoides fitoparasitos na qualidade tecnológica e na produtividade da cana-de-açúcar. *Neotropical Entomology*, v.31, n.4, p.909-14, 2002.
- . Eficiência de inseticidas no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera:Cercopidae) e seus efeitos sobre a qualidade e produtividade da cana-de-açúcar. *Bioassay*, v.1, n.5, p.1-5, 2006.

- DINARDO-MIRANDA, L. L. et al. Danos causados pelas cigarrinhas-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*) a diversos genótipos de cana-de-açúcar. *Stab: açúcar, álcool e subprodutos*, v.17, n.5, p.48-52, 1999.
- . et al. Eficiência de inseticidas e medidas culturais no controle de *Mahanarva fimbriolata* em cana-de-açúcar. *Stab: açúcar, álcool e subprodutos*, v.18, n.3, p.34-6, 2000b.
- . et al. Controle químico de cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata*, em cana-de-açúcar. *Stab: açúcar, álcool e subprodutos*, v.19, n.4, p.20-3, 2001b.
- EGGLESTON, G. Deterioration of cane juice – sources and indicators. *Food Chemistry*, v.78, p.95-103, 2002.
- ; HARPER, W. Determination of sugarcane deterioration at the factory: Development of a rapid, easy and inexpressive enzymatic method to measure mannitol. *Food Chemistry*, v.98, n.2, p.366-72, 2006.
- ; LEGENDRE, B.; TEW, T. Indicators of freeze damaged sugarcane varieties which can predict processing problems. *Food Chemistry*, v.87, n.1, p.119-33, 2004.
- . et al. Mannitol as a sensitive indicator of sugarcane deterioration and bacterial contamination in fuel alcohol production. *Zuckerindustrie*, v.132, n.1, p.33-9, 2007.
- FAOSTAT – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Statistics Division. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 16 jun. 2011.
- FERREIRA, L. V.; AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciência Tecnologia dos Alimentos*. Campinas, v.19, n.1, p.1-8, 1999.
- FEWKES, D. W. The biology of sugar cane froghoppers. In: WILLIAMS, J. R. et al. (Eds.). *Pest of Sugarcane*. Amsterdam: Elsevier, p.281-307, 1969.
- FONTANIELLA, B. et. al. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. *Plant Physiology Biochemistry*, v.41, p.1027-36, 2003.
- FRANÇA, S. C et. al. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology*, v.24, n.1-4, p.243-50, 2001.
- FRANÇOIS, J.; NEVES, M. J.; HERS, H. G. *Yeast* 7. p.575-87, 1991.
- GAGLIUMI, P. *Pragas da cana-de-açúcar: Nordeste do Brasil*. Rio de Janeiro, 1973. (Coleção Canavieira, 10).
- GALLO, C. R. Identificação de bactérias contaminantes na fermentação alcoólica. *Stab: açúcar, álcool e subprodutos*, Piracicaba, v.10, n.5, p.30-6, 1992.
- GALLO, D et. al. *Entomologia agrícola*. Piracicaba: Fealq, 2002. 920p.
- GARCIA, D. B. *Danos causados por Mahanarva fimbriolata (Stål, 1854) na qualidade da cana e processo fermentativo*. Jaboticabal, 2009. 85p. (Dissertação de Mestrado) – Faculdades de Ciências Agrícolas e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho (Unesp).
- GARCIA, J. F. Técnica de criação e tabela de vida de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera:Cercopidae). Piracicaba, 2002, 59f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

- \_\_\_\_\_; SVERZUT JUNIOR, J. V. Expansão da colheita mecanizada aumenta a incidência da cigarrinha-das-raízes. *Idea New*, ed.92, 2008. Disponível em <<http://www.ideaonline.com.br>>. Acesso em: 28 mar. 2009.
- \_\_\_\_\_; BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P. Biology and fertility life table of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.63, n.4, 2006.
- \_\_\_\_\_. et. al. Sítio de alimentação da *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) on sugarcane. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, v.64, n.5, p.555-7, 2007.
- GERVÁSIO, R. C. R. G. et al. Aspectos biológicos de *Tuta absoluta* (meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) em dois genótipos de tomateiro contrastantes quanto ao teor de 2-tridecanona nos folíolos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.23, n.2, p.247-51, 1999.
- GODSHALL, M. A. Removal of colorants and polysaccharides and the quality of white sugar. In: ASSOCIATION A. V. H. SYMPOSIUM, 6. 1999, Reims. *Proceedings...* Reims: Association Andrew van Hook, 1999. p.28-35.
- GONÇALVES, T. D. *Danos causados por Mahanarva fimbriolata em cana-de-açúcar: reflexos na qualidade da matéria-prima e fermentação etanólica*. Jaboticabal, 2003. 51p. (Dissertação de Mestrado) – Faculdades de Ciências Agrícolas e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho (Unesp).
- \_\_\_\_\_. et al. Qualidade da matéria-prima em função de diferentes níveis de danos promovidos pela cigarrinha-das-raízes. *Stab: açúcar, álcool e subprodutos*, v.22, n.2, p.29-33, 2003.
- GUIMARÃES, E. R. *Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar: resistência genotípica e interação planta-praga*. Jaboticabal, 2007. 53p. Tese (Doutorado em Agronomia: Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- HAILE, F. J. The influence of cultivar and plant architecture on yield loss In: PETERSON, R. K. D.; HIGLEY L. G. (Eds.). *Biotic Stress and Yield Loss*. Boca Raton: CRC Press, 2001, p.99-116.
- HALLSWORTH, J. E. Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.85, n.2, p.125-37, 1998.
- HIGLEY, L. G.; BROWDE, J. A.; HIGLEY, P. M. Moving towards new understandings of biotic stress interactions. In: BUXTON, D. R. et al. (Eds.). *International Crop Science I*. Madison: Crop Science Society of America, 1993.
- \_\_\_\_\_; PETERSON, R. K. D. The biological basis of the EIL. In: \_\_\_\_\_.; PEDIGO, L. P. (Eds.). *Economic Thresholds for Integrated Pest Management*. University of Nebraska Press, Lincoln, 22, 1996.
- LEFF, B.; RAMANKUTTY, N.; FOLEY, J. A. Geographic distribution of major crops across the world. *Global Biogeochemical Cycles*, Washington, v.18, GB. 1009 doi:10.1029/2003GB002108, 2004.
- LESTARI, P. et al. Differentially expressed genes related to symbiotic association in a supermodulating soybean mutant and its wild-type. *Mol. Plant Pathol.*, v.7, n.4, p.235-47, 2006.

- LILLIE, S. H.; PRINGLE, J. R. *Journal Bacteriology*, v.143, p.1384-94, 1980.
- LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantificação da flocculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v.21, n.1, p.63-8, 2001.
- MACEDO, N.; CAMPOS, M. B. S.; ARAÚJO, J. R. Insetos nas raízes e colo da planta, perfilhamento e produtividade em canaviais colhidos com e sem queima. *Stab: açúcar, álcool e subprodutos*, Piracicaba, v.15, n.3, p.18-21, 1997.
- MACEDO, T. B. et al. Photosynthetic responses of soybean to soybean aphid (Homoptera: Aphididae) injury. *Journal of Economic Entomology*, v.96, p.188-93, 2003.
- MACEDO, D. Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* visando o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. Piracicaba, 2005. 87f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- MADALENO, L. L. *Cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar e qualidade do açúcar produzido*. 2010. 80f. Tese (Doutado em Agronomia: Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.
- MADALENO, L. L. et al. Influence of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) injury on the quality of cane juice. *Neotropical Entomology*, v.37, n.1, p.68-73, 2008.
- MENDONÇA, A. F.; BARBOSA, G. V. S.; MARQUES, E. J. As cigarrinhas da cana-de-açúcar (Hemiptera: Cercopidae) no Brasil. In: MENDONÇA, A. F. (Ed.). *Pragas da cana-de-açúcar*. Maceió: Insetos & Cia., 1996.
- MORSY, M.; DE LOS REYES, B. G.; STEWART, J. M. C. D. Characterization of differentially expressed rice genes in response to cold stress using cDNA-AFLP. (Unpublished).
- MUTTON, M. J. R. Reflexos da qualidade da matéria-prima no processo industrial. *II Simpósio Internacional da Stab – Perdas de açúcares: do campo ao produto final*. Águas de São Pedro, 2003 (CDroom).
- . *Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica*. Workshop sobre produção de etanol: qualidade da matéria-prima. Lorena, 2008. Disponível em: <<http://www.apta.sp.gov.br>>. Acesso em: 9 fev. 2009.
- MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Maturadores químicos em cana-de-açúcar: III – Efeitos na fermentação etanólica e microbiota do mosto. *8º Congresso Nacional da Stab*. Recife, p.452-7, 2002.
- NARENDRANATH, N. V. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Eds.). *The Alcohol Textbook*. 4.ed. Nottingham: Nottingham University Press, p.287-98, 2003.
- ; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid ad lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.26, p.71-177, 2001.

- NOVAES, F. V. Processos Fermentativos. In: MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. *Aguardente de cana: produção e qualidade*. Jaboticabal: Funep, 1992, p.37-65.
- OKOLO, B.; JOHNSTON, J. R.; BERRY, D. R. Toxicity of ethanol, n-butanol and iso-amyl alcohol in *Sacch. cerevisiae* when supplied separately and in mixtures. *Bio-technology Letters*, Kew, v.9, n.6, p.431-4, 1987.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, p.10-4, 2001.
- PANDEY, B. N.; SRINIVASAN, S. The effect of sugarcane quality on its processing parameters. *Indian Sugar*, Calcutta, v.27, n.3, p.131-6, 1972.
- PARRA, J. R. P. *Controle das principais pragas da cana-de-açúcar. Produção de cana-de-açúcar*. Piracicaba: Fealq, p.184-97, 1993.
- PETERSON, R. K. D.; HIGLEY, L. G. Biotic Stress and Yield Loss. United States of America: CRC Press, 261p., 2001.
- \_\_\_\_\_. et al. Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae) injury affects photosynthesis of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. *Environ. Entomol.*, 27, 373, 1998.
- PHELPS, C. D.; YOUNG, L. Y. Microbial metabolism of the plant phenolic compounds ferulic and syringic acids under three anaerobic conditions. *Microbial Ecology*, v.33, p.206-15, 1996.
- POLAKOVIC, M.; HANDRIKOVÁ, G.; KOSIK, M. Inhibitory effects of some phenolic compounds on enzymatic hydrolysis of sucrose. *Biomass and Bioenergy*, v.3, n.5, p.369-71, 1992.
- PRECETTI, A. A. C. M.; TERÁN, F. O. Gorgulhos da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978, e *Metamasius hemipterus* (I, 1765) (Col., Curculionidae). In: REUNIÃO TÉCNICA AGRONÔMICA: PRAGAS DA CANA-DE-AÇÚCAR, 1, 1983, Piracicaba, *Anais...*, Piracicaba: Copersucar, 1983. p.32-7.
- PRECETTI, A. A. C. M.; ARRIGONI, E. B. *Aspectos bioecológicos e controle do besouro Sphenophorus levis Vaurie, 1978 (Coleoptera, Curculionidae) em cana-de-açúcar*. São Paulo: Copersucar, 1990. 15p. (Boletim técnico Copersucar – Edição Especial).
- RAVANELI, G. C. *Efeito da cigarrinha-das-raízes com tratamento químico sobre a qualidade da matéria-prima e fabricação de álcool*. Jaboticabal, 2005. 78p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp).
- \_\_\_\_\_. *Qualidade da matéria-prima, microbiota fermentativa e produção de etanol sob ataque de Mahanarva fimbriolata em cana-de-açúcar*. Jaboticabal, 2010. 90p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp).
- \_\_\_\_\_. et al. Spittlebug infestation in sugarcane affects ethanolic fermentation. *Scientia Agricola*, v.63, n.6, p.543-6, 2006.
- \_\_\_\_\_. et al. Spittlebug impacts on sugarcane quality and ethanol production. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.46, n.2, p.120-9, fev. 2011

- ROSSATO JUNIOR, J. A. de S. et al. Resposta fotossintética e reflexo na produtividade de plantas de cana-de-açúcar sob os estressores *Diatraea saccharalis* e *Mahanarva fimbriolata*. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 2010, Natal.
- . et al. Sugarcane response to two biotic stressors: *Diatraea saccharalis* and *Mahanarva fimbriolata*. *International Sugar Journal*, London, v.113, 2011.
- SAROSH, B. R.; MEIJER, J. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP reveals novel insights during methyl jasmonate, wounding and insect attack in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*, v.64, p.425-38, 2007.
- SEYLE, H. The evolution of the concept of stress, *American Scientist*, v.61, n.692, 1973.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. *Biometry*. 2.ed., New York: W.H. Freeman and Co., 1981.
- SILVA, R. J. N. et al. Infestation of froghopper nymphs changes the amounts of total phenolics in sugarcane. *Scientia Agricola*, v.62, n.6, p.543-6, 2005.
- SIMIONI, K. R. et al. Efeito da variedade e época de colheita no teor de fenóis totais em cana-de-açúcar. *Stab: açúcar, álcool e subprodutos*, Piracicaba, v.24, n.3, p.36-9, 2006.
- SOUZA, Z. M. de et al. Manejo de palhada de cana colhida sem queima, produtividade do canavial e qualidade do caldo. *Ciência Rural*, v.35, n.5, p.1062-8, 2005.
- STINGEL, E. Distribuição espacial e plano de amostragem para a cigarrinha-das-raízes, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854), em cana-de-açúcar. Piracicaba, 2005. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- STOKES, J. L. Influence of temperature on the growth and metabolism of yeast. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. *The yeast*. New York: Academic Press, p.119-34, 1971.
- STUPIELLO, J. P. Alguns aspectos de qualidade da matéria-prima. *Stab: açúcar, álcool e subprodutos*, v.7, n.3,4 e 5, p.542-4. 1989.
- . Matéria-prima: qualidade total. In: SEMINÁRIO ROUNDUP – EFEITO MATURADOR I, 1993, Guarujá. *Anais...*, p.83-87.
- . Efeitos dos não-açúcares. *Stab: açúcar, álcool e subprodutos*, v.20, n.3, p.10, 2002.
- ; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. *Saccharum*, v.17, p.43-6, 1981.
- SUINAGA, F. A et al. Resistência por antibiose de *Lycopersicon peruvianum* à traça do tomateiro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.22, n.2, p.281-5, 2004.
- TANIMOTO, T. The press method of cane analysis. *Hawaiian Planter's Record*, n.57, p.133-50, 1964.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2004.
- UNICA. *União da indústria de cana-de-açúcar*. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 22 jun. 2011.
- VAADIA, Y. The impact of plant stresses on crop yields, In: KEY, J. L.; KOSUGE, T. (Eds.). *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*. New York: Alan R. Liss, 1985.



- VENTURA, R. *Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo*. Rio Claro, 2007. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp).
- WELTER, S. C. Responses of plants to insects: eco-physiological insights. In: BUXTON, D. R. et al. (Eds.). *International Crop Science I*. Madison: Crop Science Society of America, 1993.
- YOKOYA, F. *Fabricação da aguardente da cana*. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995. (Série Fermentações Industriais, 2).
- \_\_\_\_\_. OLIVA-NETO, P. Characteristics of yeast flocculation by *Lactobacillus fermentum*. *Revista de Microbiologia*, v.22, p.21-7, 1991.
- YOUNGMAN, R. R. BARNES, M. M. Interactions of spider mites (Acari: Tetranychidae) and water stress on gas-exchange rates and water potential of almond leaves. *Environmental Entomology*, v.15, n.594, 1986.

## Produção, caracterização e utilização do biodiesel de tucumã originário da região amazônica

*Wanderley J. Melo, Afonso Lopes, Marcelo F. de Oliveira, Adelir A. Saczk, Zuy M. Magriotis, Marco A. Modenes Jr, Hideko Yamanaka, Maria V. B. Zanoni, Nelson R. Stradiotto<sup>1</sup>*

### Introdução

No início da década de 1970, ocorreu a crise do petróleo, provocada por fatores políticos e econômicos. Conseqüentemente, muitos países importadores desse produto foram afetados, inclusive o Brasil. Desde então, foi necessária a busca por novas fontes alternativas de energia, motivando a classe científica a desenvolver tecnologias as quais permitiriam substituir gradualmente o combustível fóssil por fontes energéticas renováveis.

No Brasil, o biodiesel foi lançado após a realização de inúmeros testes de aplicabilidade, realizados entre 1979 e 1980 pela Nutec – Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial, pelo Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, pelo Departamento de Transporte da Coelce (Companhia de Eletricidade do Ceará) e pelo CTA (Centro Técnico Aeroespacial do Ministério da Aeronáutica).

---

<sup>1</sup> Os autores agradecem a colaboração prestada na produção deste trabalho pelos pesquisadores: Maristela T. Silva, Luis G. Vieira, Carolina S. Nascimento, Rean A. Zaninetti, Luma S. Torres, Thaisa M. Cantele (FCAV/Unesp); Andressa T. Vieira (FFCLRP/USP); Sara S. Vieira, Nadiene A. V. Santos, Robson A. Pereira, Guilherme T. A. Fassio (DQI/UFLA); Marcelo B. Garcia, Diana M. Serafim, Fabiana M. M. Paschoal, Paula G. Fenga (IQ/Unesp); Leomar P. Lima (Ifet/Triangulo Mineiro); Antonio C. F. Batista, Hugo S. Rodrigues (Facip/UFU); Gilberto H. A. Koike.

Atualmente, estas pesquisas tomaram uma proporção ainda maior por causa de razões econômicas, sociais e ambientais. Do ponto de vista econômico, sua justificativa está ligada diretamente à substituição das importações do diesel mineral, o que acarretará maior sustentabilidade econômica para o país. A questão ambiental fica atendida com a significativa redução na emissão dos gases causadores do efeito estufa, enquadrando, por exemplo, o biodiesel nos acordos do Protocolo de Kyoto e nas diretrizes dos Mecanismos de Desenvolvimento Limpo (MDL), além da possibilidade de venda de cotas de carbono (Holanda, 2004). Na parte social, a utilização das fontes energéticas renováveis aumentará a geração de empregos no campo, principalmente nas regiões pouco privilegiadas, além de proporcionar maior oferta de insumos para a indústria de alimentos.

Frente aos atuais acontecimentos políticos, marcados pela adoção das fontes renováveis de energia, o biodiesel tem sido um dos principais combustíveis estudados, pois a diversidade de biomassa existente para sua produção é muito grande.

Inicialmente, a biomassa tem atraído muita atenção nestas últimas décadas por se tratar de uma fonte de energia renovável e em função de seu uso sustentado não provocar danos ao meio ambiente. A mesma compreende todo material orgânico, não fóssil, que tenha conteúdo de energia química em seu interior, o que inclui todas as vegetações aquáticas ou terrestres, lixo orgânico, resíduo de agricultura e outros tipos de restos industriais (Omachi et al., 2004). Entre as fontes de biomassa consideradas adequadas e disponíveis para a consolidação de programas de energia renovável, os óleos vegetais têm tido prioridade por apresentarem grande biodiversidade em todo mundo (Demirbas, 2003).

Os óleos são substâncias de origem vegetal, animal ou microbiana, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos apolares. Compostos, principalmente, por triglicerídeos. Os ácidos graxos presentes nos óleos são constituídos, geralmente, por ácidos carboxílicos, contendo de 4 a 30 átomos de carbono em sua cadeia, podendo ser saturada ou insaturada.

Os ácidos graxos saturados organizam-se com facilidade em cristais, o que resulta no aumento das forças de Van der Waals e, conseqüentemente, pontos de fusão relativamente elevados, já que o ponto de fusão aumenta em função do aumento do peso molecular. Para os ácidos graxos insaturados, a formação de isômeros *cis* em sua estrutura causa interferência na or-

ganização cristalina de seu composto, resultando na redução da atração de Van der Waals entre as moléculas. Desta forma, ácidos graxos insaturados possuem pontos de fusão mais baixos.

Entre as inúmeras espécies oleaginosas de que se tem conhecimento na literatura, as mais conhecidas são: soja, canola, colza, mamona, girassol, amendoim, algodão, palma, babaçu, entre muitos outros vegetais em forma de sementes, amêndoas ou polpas. Muitas outras oleaginosas podem ser encontradas na região amazônica, a qual apresenta grande biodiversidade, já que esta ocupa mais de 50% do território brasileiro (Pereira-Junior et al., 2008).

O fato de a Amazônia ser uma região muito extensa e pouco desenvolvida leva a muitos problemas, um deles é a falta de acesso à energia elétrica, especialmente nas comunidades isoladas. Um exemplo a ser citado, é que, em 2005, apenas 32 das mais de 4.600 comunidades isoladas (0,7%) eram supridas por energia elétrica por meio de uma concessionária responsável (Correia, 2005).

A falta de acesso à energia elétrica está diretamente relacionada com baixo índice de desenvolvimento social das populações residentes nas comunidades isoladas localizadas na Amazônia, pois, segundo o Ministério de Minas e Energia (2003), a falta do atendimento em energia elétrica no Brasil, em especial na Amazônia, é uma das causas do aumento do nível de desigualdade social e regional do país.

A principal dificuldade para estender o acesso à energia elétrica está ligada ao tamanho do território, fato esse que impede a extensão das redes de eletrificação, como ocorre no restante do país.

A alternativa atualmente empregada para viabilizar a geração de energia elétrica nessas comunidades isoladas foi a instalação de pequenos sistemas geradores elétricos a diesel. Contudo, sob o ponto de vista econômico, esta solução não é favorável por causa dos custos de transporte do combustível (Correia, 2005).

Assim, o emprego de recursos naturais de forma manejada na geração local de energia elétrica vem sendo considerado uma das alternativas mais promissoras, em especial o biodiesel produzido a partir de óleos vegetais extraídos de espécies oleaginosas nativas.

Os óleos vegetais (triacilglicerídeos) podem ser convertidos em biodiesel a partir de reações de transesterificação, conforme a Figura 13.1, com um

álcool de cadeia curta como, por exemplo, metanol ou etanol, na presença de um catalisador, resultando como produto final o biodiesel (mistura de ésteres) e o subproduto glicerina (Schuchardt et al., 1998)

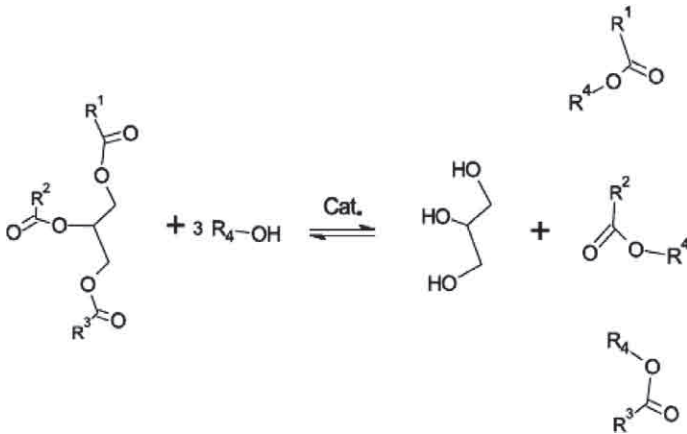


Figura 13.1 – Reação de transesterificação de triglicerídeos para produção de biodiesel.

Fonte: Lôbo et al., 2009

Nessa reação, são necessários três mols de álcool para cada mol de triglicerídeo. Na prática, é sempre utilizado um excesso de álcool, de modo a aumentar o rendimento em ésteres (deslocar a reação para lado dos produtos) e permitir a separação do glicerol formado.

Sendo assim, o biodiesel pode ser uma energia alternativa e renovável, em especial na região amazônica, em função da grande biodiversidade de espécies oleaginosas, além de gerar um desenvolvimento socioeconômico para as comunidades (Quadrelli; Peterson, 2007).

Diante de toda essa biodiversidade de oleaginosas promissoras para a produção do biodiesel no Brasil, o tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) foi a escolhida para este estudo, que tem por finalidade produzir biodiesel a partir de seu fruto.

O tucumã é uma espécie de palmeira da família *Arecaceae*, típica da Floresta Amazônica, Figura 13.2, com até 2,5 metros de altura e caule com espinhos nos entrenós, medindo 25 cm de diâmetro, número de pinas está entre 100 e 130 por cacho, regularmente agrupadas e dispostas em diferentes planos. Frutifica o ano todo, porém o pico da produção ocorre nos meses de janeiro a junho (ibidem).



Figura 13.2 – Palmeira de tucumã da família *Arecaceae* (*Astrocaryum aculeatum*).

O fruto do tucumã é composto de um caroço lenhoso quase preto, que contém uma amêndoa de massa branca oleaginoso, bastante dura, recoberta de uma película de cor parda. A polpa apresenta cerca de 47,50% de óleo, enquanto a amêndoa apresenta de 32,50% a 43,50% de óleo (Pesce, 2009).

Segundo Lorenzi et al. (2004), o tucumanzeiro é uma espécie amplamente utilizada pela população local, desde as folhas até os frutos, pois são ricos em vitamina A, ácido oleico (insaturado) e palmítico (saturado).

Embora ainda não existam projetos de desenvolvimento para o tucumã, a cadeia de produção está começando a ser estudada para orientar trabalhos futuros, pois a planta é produtiva (Tabela 13.1) e as sementes apresentam grande percentual oleaginoso, tornando-a uma nova fonte renovável de energia para produção do biodiesel.

Tabela 13.1 – Produtividade de oleaginosas

<i>Espécie</i>	<i>Produtividade (kg de fruto/ ha)</i>
Andiroba	180 – 200
Castanha	200 – 400
Tucumã	500
Cacau	500 – 1.500
Dendê	3.500

\*Fonte: Ministério de Minas e Energia, 2008

## Coleta dos frutos do tucumã e extração do óleo

Neste item, são descritos os processos de amostragem e extração do óleo de tucumã para avaliação das características físicas e químicas e as relações com a fertilidade do solo.

Com o objetivo de avaliar o potencial do tucumã para produção de óleo para síntese de biodiesel, considerando a existência de pelo menos duas variedades da espécie na Amazônia (*Astrocaryum aculeatum* e *Astrocaryum vulgare*, conhecidos como tucumã-do-amazonas e tucumã-do-pará, respectivamente), foi feita uma avaliação exploratória de sua dispersão no estado do Acre a relação entre a fertilidade do solo e a produtividade.

Primeiramente, a área foi georreferenciada por meio de um receptor de GPS. No mês de julho quando os frutos de tucumã estavam verdes, foram identificadas plantas ao longo das BR-364 e BR-317 numa faixa de 100 metros à direita ou à esquerda destas rodovias, até aproximadamente 150 km de Rio Branco (AC). Em cada uma das 22 áreas selecionadas, foi feita uma amostragem de solo para avaliação do nível de fertilidade.

A colheita dos frutos foi realizada entre o final do mês de outubro e o começo do mês de dezembro, quando metade dos frutos de pelo menos um dos cachos estava maduro. Nessas áreas, foram coletados todos os cachos de tucumã, que foram pesados (balança com capacidade 50 kg x 500 g). Destes, foram selecionados 30 frutos maduros e as amostras que continham frutos totalmente maduros foram imediatamente processadas, enquanto as contendo frutos não maduros foram acondicionados em cestos plásticos, que foram mantidos em temperatura ambiente ( $35^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) e à sombra para complementar a maturação (Figura 13.3).



Figura 13.3 – Frutos de tucumã. A e B são frutos em fase de maturação; C é o fruto totalmente maduro.

Os frutos foram despolpados manualmente e separados em: polpa (epicarpo + mesocarpo), castanha ou caroço (endocarpo) e amêndoas (sementes retiradas do interior do endocarpo), cujas massas foram determinadas. Os caroços foram descartados e as amêndoas foram secas em estufa com circulação forçada de ar e mantida a 65°C, moídas em moinho de faca, com peneira de malha de 2 mm, e usadas para extração da fração lipídica por solvente.

Metade das amostras de polpa foi processada conforme metodologia descrita para as amêndoas, e a outra metade foi extraída por prensagem mecânica, que é indicada para materiais com teor de óleo maior que 25% (Parente, 2006). Para materiais com baixo teor de óleo (< 25%), é indicada a extração química por solventes. A prensa contínua utilizada foi uma mini-prensa Ercitec Modelo MPE-40.

As amostras de polpa foram colocadas em estufa a 38°C por 48 horas para que atingissem teor de umidade entre 5% e 8%, e então foram aquecidas em banho-maria a 70°C e transferidas para o alimentador mecânico da prensa de forma contínua e constante. Os produtos da prensagem foram o óleo bruto e a torta.

A determinação do teor de lipídeo total nas amostras de amêndoas, polpa e torta foi realizada no óleo obtido por extração com hexano. As amostras foram previamente trituradas. Cerca de 5 g, secos a 65°C, foram acondicionados em cartucho de celulose, que foi coberto com algodão desengordurado e colocado no extrator de Soxhlet, ao qual se adicionou hexano de modo a cobrir o cartucho com 2 vezes seu volume. Após um período de 6 horas de extração, o balão com a solução óleo – hexano, previamente seco e pesado, foi colocado em estufa mantida a 105°C até obtenção de massa constante. Por diferença de massas, calculou-se a porcentagem de óleo extraída.

A porcentagem de amêndoas nos frutos de tucumã variou de 20,6% a 27,1% e foi afetada pelo local de amostragem (Gráfico 13.1). O teor de umidade das amêndoas variou de 38,0% a 45,0%, enquanto o teor de lipídeos totais variou de 21,0% a 22,8%, com um valor médio de 22,1%. Os resultados obtidos para umidade e lipídeos nas amêndoas de tucumã têm sido reportados por diferentes autores (Castro et al., 2006; Figliuolo et al., 2007; Nascimento et al., 2007; Pantoja et al., 2006) sendo os valores bastante variados, o que pode ser causado pela diversidade genética das plantas e pelo estágio de maturação dos frutos no momento da amostragem.



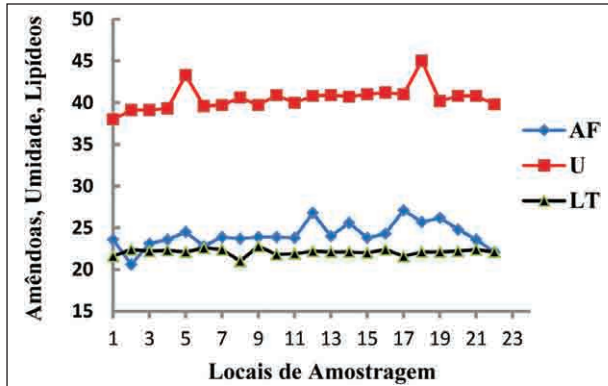


Gráfico 13.1 – Porcentagem de amêndoas nos frutos de tucumã (AF), teor de umidade (U) e de lipídeos totais (LT).

O rendimento aparente da prensa oscilou na faixa de 70% a 73%, variação esta que pode ter ocorrido por causa de os frutos das diferentes áreas não terem sido colhidos no mesmo estágio de maturação.

A porcentagem de polpa no fruto (RP) variou de 38,6% a 59,0%, valores estes próximos aos encontrados por Ferreira et al. (2005) e Nascimento et al. (2007), que foram de 54,4% e 47,0%, respectivamente (Gráfico 13.2). O teor de umidade na polpa variou de 43,4% a 47,4%, valores superiores aos obtidos por Figliuolo et al. (2007), que foi de 38,4%. O teor de lipídeos na polpa de tucumã variou de 30,6% a 35,0%, acima do obtido por Pantoja et al. (2006), que foi de 6,4%.

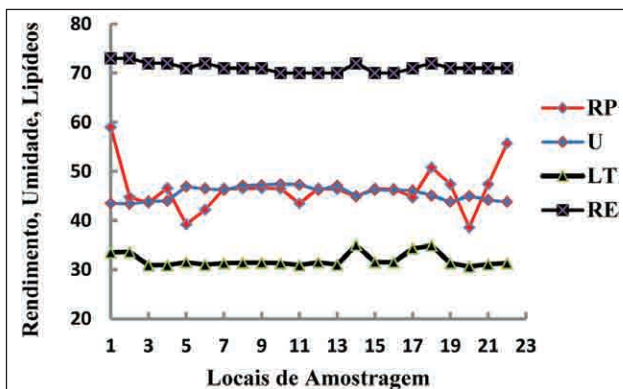


Gráfico 13.2 – Porcentagem de polpa (RP), teor de umidade (U), lipídeos totais (LT) e rendimento de extração do óleo (RE) da polpa de sementes de tucumã.

Por meio da análise multivariada, a variabilidade retida nos componentes principais CP1 e CP2 explicou 60,3% da variabilidade original, e CP1 e CP2 retiveram 37,7% e 22,6%, respectivamente (Gráfico 13.3). A variabilidade retida nos componentes principais CP1 e CP3 explicou 52,1% da variabilidade original, e CP1 e CP3 retiveram 37,7% e 14,4%, respectivamente.

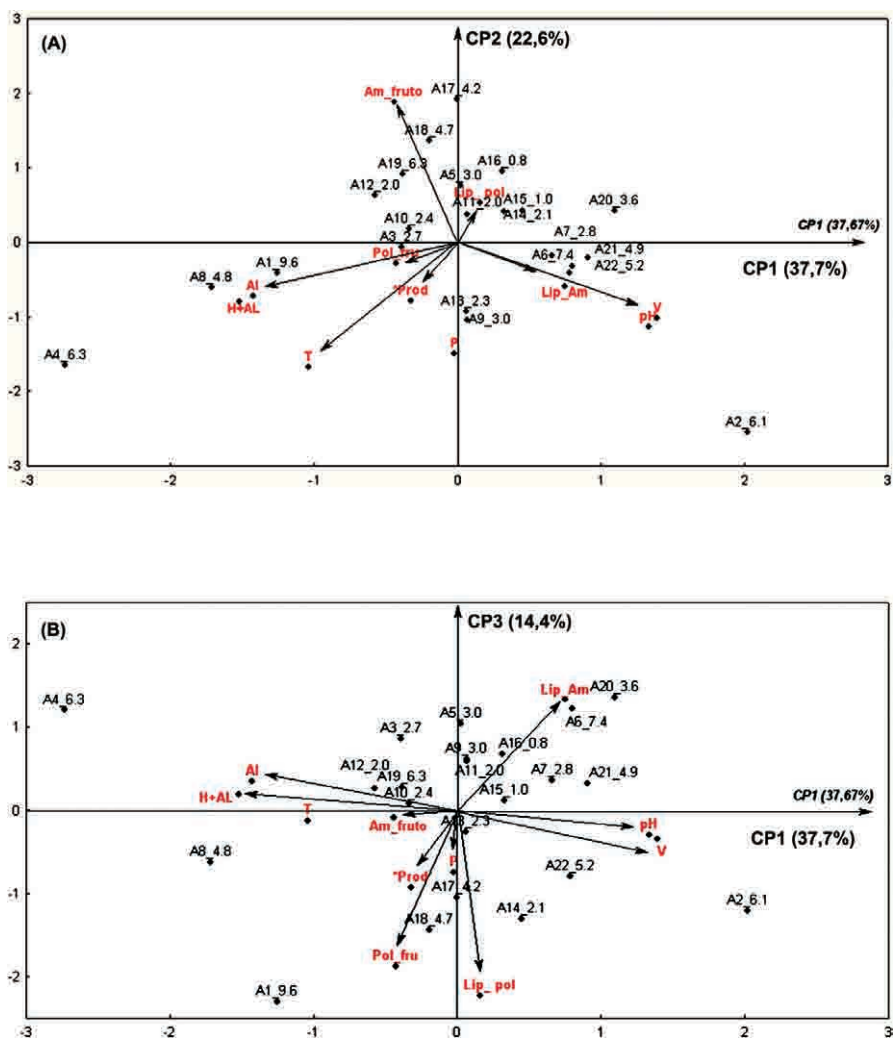


Gráfico 13.3 – Gráfico bidimensional dos componentes principais; (A) CP1-CP2 e (B) CP1-CP3.

Em CP1, as variáveis com maior poder discriminatório foram: H+Al (-0,93), Al (-0,87), V (0,85), pH (0,81) e T (-0,67), e em CP2, fruto (0,79), T (-0,70) e P (-0,63). Em CP3, as variáveis com maior poder discriminatório foram lipídeos na polpa (Lip\_pol = -0,80), polpa por fruto (Pol\_fruto = -0,67).

O comportamento das plantas amostradas variou em função do local de amostragem, da fertilidade do solo e, provavelmente, pelo estágio de maturação dos frutos. Algumas plantas apresentaram maior quantidade de amêndoas nos frutos, porém tenderam a apresentar menor produtividade, enquanto outras apresentaram boa produtividade em solo com elevada capacidade de troca catiônica, elevada saturação por Al e elevada acidez. Houve plantas que apresentaram boa produtividade, mesmo em solos ácidos e de baixa fertilidade, comprovando que o tucumazeiro cresce em solo com baixa fertilidade. Algumas plantas apresentaram maior produtividade de óleo por possuírem maior quantidade de polpa nos frutos ou por apresentarem maior quantidade de lipídeos na polpa. Os resultados deixaram claro a variabilidade na produção de lipídeos pelas plantas de tucumã.

Os locais de amostragem influenciaram na quantidade de lipídeos totais na amêndoa e na polpa do tucumã, assim como no rendimento aparente da prensa. O tucumã possui uma boa produção de óleo, apresentando um elevado potencial para produção de biodiesel.

## Caracterização físico-química do óleo de tucumã

Para a produção do biodiesel, foi necessária a avaliação das características físico-químicas do óleo de tucumã, matéria-prima do processo, pois a reação de transesterificação poderia ser influenciada pelas propriedades do óleo, sendo algumas indesejáveis para o processo de obtenção do biodiesel, podendo gerar produto de má qualidade.

Os resultados obtidos referentes às análises físico-químicas do óleo de tucumã são mostrados na Tabela 13.2. Todas as análises foram realizadas de acordo com os procedimentos experimentais descritos na A.O.A.C. (1984).

A análise do índice de acidez, determinada experimentalmente, mostra que a média das análises para o índice de acidez do óleo de tucumã foi  $6,52 \pm 0,27$  mg KOH g<sup>-1</sup>. A alta acidez encontrada para o óleo de tucumã pode

Tabela 13.2 – Atributos físico-químicos do óleo de Tucumã

<i>Índices</i>	<i>Unidades</i>	<i>Resultados</i>
Acidez	mg KOH g <sup>-1</sup>	6,52 ± 0,27
Iodo	g I <sub>2</sub> 100 g <sup>-1</sup>	113,53 ± 3,60
Peróxido	meq 1000 g <sup>-1</sup>	30,97 ± 1,73
Saponificação	mg KOH g <sup>-1</sup>	213,0 ± 11,00
Densidade	g cm <sup>-3</sup>	0,9041 ± 0,0046
Viscosidade	rpm	67,70

ser atribuída a seu estado de conservação, que está relacionado com a natureza e qualidade da matéria-prima, a escolha de sementes de baixa qualidade, aumento da perda da neutralização, armazenamento impróprio e/ou processamento insatisfatório, que é acompanhada da formação de ácidos graxos livres.

O óleo de tucumã analisado apresentava boa aparência, mas com partículas em suspensão. Tendo em vista que o referido óleo possui um índice de acidez alto, segundo Santos et al. (2001) um óleo com acidez inferior a 1% é classificado comercialmente como óleo industrial do tipo 1. Logo, o óleo de tucumã analisado não pode ser classificado nesta categoria.

A qualidade das sementes utilizadas foi um fator preponderante para o elevado índice de acidez apresentado pelo óleo de tucumã, visto que a elevada acidez pode dificultar processos de transesterificação em virtude da formação de sabão, pois a acidez é decorrente da hidrólise parcial dos glicerídeos, razão pela qual não é uma constante ou característica, mas sim uma variável intimamente ligada à natureza e qualidade do óleo.

Outro atributo analisado foi o índice de iodo presente na amostra, o qual apresentou um valor de 113,53 ± 3,60 g I<sub>2</sub> 100 g<sup>-1</sup>. O número de gramas de iodo absorvido por 100 g de óleo indica o grau de insaturação das gorduras ou a medida do grau de insaturação dos ácidos graxos presentes. Sob determinadas condições, o iodo é introduzido nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados e triglicerídeos. Assim, quanto maior a insaturação de um ácido graxo, maior será sua capacidade de absorção de iodo e, consequentemente, maior também será o índice. O óleo de tucumã apresenta muitas insaturações por causa da grande quantidade de ácidos graxos insaturados, principalmente oleico e linoleico. Estes são facilmente oxidados em virtude

das duplas ligações nas cadeias de carbono de sua estrutura química, resultando em maior capacidade para absorção do iodo.

O índice de saponificação obtido para o tucumã foi de  $213,31 \pm 11,0$  mg KOH g<sup>-1</sup>. De acordo com o padrão britânico (Freire, 2001), o óleo de primeira qualidade deve apresentar índice de saponificação entre 177 e 187 mg KOH g<sup>-1</sup>, mas esses valores são estabelecidos para óleos refinados, o que não é o caso do óleo analisado neste trabalho.

O índice de saponificação estabelece o grau de deterioração e estabilidade, e está relacionado com o peso molecular dos ácidos graxos. Quanto menor o peso molecular maior será o índice de saponificação. Este índice também pode garantir a qualidade do óleo, indicando possíveis adulterações pela adição de outros óleos, quando este difere muito do padrão de referência.

Pelos resultados obtidos, o óleo de tucumã apresenta grande quantidade de ácidos graxos insaturados em sua estrutura, e estes são facilmente oxidados em virtude das duplas ligações nas cadeias de carbono de sua estrutura.

Segundo Moretto e Fett (1998), este índice é inversamente proporcional ao peso molecular médio dos ácidos graxos que compõem os triglicerídeos. Desta forma, o óleo de tucumã deve possuir alta proporção de ácidos graxos de baixo peso molecular presentes em sua cadeia.

O resultado obtido para o índice de peróxido foi de  $30,97 \pm 1,73$  meq  $10^{-3}$  g<sup>-1</sup>. Este resultado indica que o óleo de tucumã encontra-se parcialmente oxidado, pois segundo Malacrida (2003) este índice não deve ultrapassar o valor de 10 meq  $10^{-3}$  g<sup>-1</sup>.

Isso pode ter ocorrido em função de um fenômeno químico bastante complexo, envolvendo reações radicalares capazes de autopropagação, e que dependem do tipo de ação catalítica (temperatura, íons metálicos, radicais livres, pH). No decurso da sequência reacional, classicamente dividida em iniciação, propagação e terminação, é possível distinguir três etapas de evolução oxidativa: a) Desaparecimento dos substratos de oxidação (oxigênio, lipídio insaturado); b) Aparecimento dos produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos), cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes; c) Aparecimento dos produtos secundários de oxidação, obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis), cuja natureza e proporção dependem de diversos fatores (Silva et al., 1999).

Pode ocorrer também a oxidação enzimática por ação da lipoxigenase. Esta enzima atua sobre os ácidos graxos poli-insaturados (ácidos linoleico, linolênico e seus ésteres), catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poli-insaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas, os quais podem envolver-se em diferentes reações degradativas, semelhantes aos processos de auto-oxidação, originando diversos produtos. O processo de catálise enzimática decorre com maior especificidade, em termos de substrato e de produtos finais, do que o processo de auto-oxidação (ibidem). Um aspecto importante da atuação da lipoxigenase é o que se relaciona com sua capacidade para co-oxidar substratos (carotenoides, tocoferóis, clorofila, proteínas etc.), sendo responsável pela iniciação de novos processos oxidativos.

Assim, os ácidos graxos do óleo de tucumã podem favorecer o desenvolvimento da rancidez oxidativa por causa da grande quantidade de ácidos graxos insaturados, principalmente oleico e linoleico. Estes são facilmente oxidados em virtude das duplas ligações nas cadeias de carbono de sua estrutura química. O processo de oxidação é a principal causa da perda da qualidade do produto e da reação, afetando seu sabor, aroma, cor e textura além de resultar na formação de compostos tóxicos e um alto decréscimo em seu valor nutritivo.

A densidade do óleo de tucumã, realizada experimentalmente, foi de  $0,9041 \pm 0,0046 \text{ g cm}^{-3}$ . Esse índice indica que o óleo de tucumã apresenta alto grau de insaturação, pois para os triglicerídeos, quanto menor for seu peso molecular mais alto será seu grau de insaturação. Portanto, o óleo de tucumã deve possuir muitas insaturações em sua molécula e possuir ácidos com baixo peso molecular.

As medidas de viscosidade do óleo de tucumã para as frequências de 30 rpm e 40 rpm encontradas foram de 67,4 cp e 66,4 cp, respectivamente na temperatura de 24,6°C. Segundo Moretto e Fett (1998), a viscosidade aumenta com o comprimento das cadeias dos ácidos graxos dos triglicerídeos e diminui quando aumenta a insaturação.

A viscosidade dos óleos é relativamente alta, superior à da água, em função das atrações intermoleculares das cadeias dos ácidos graxos, que constituem os triglicerídeos. Em geral, a viscosidade dos óleos decresce ligeiramente com o aumento da insaturação. Logo, o fato de o óleo de tucumã apresentar baixa viscosidade pode ser decorrência de este possuir muitas

insaturações em virtude das duplas ligações nas cadeias de carbono de sua estrutura.

Assim, para um controle efetivo da extração do óleo é importante conhecer todas as etapas do processamento, bem como as possíveis alterações que podem ocorrer durante o processo, já que o óleo, assim como todo produto de origem vegetal, é passível de modificações nas características físico-químicas. O conhecimento das análises a serem realizadas e os parâmetros usados para ajustar o processo de extração de óleo são fundamentais para um melhor acompanhamento de todo o processo, desde a matéria-prima, até produto final.

Portanto, as análises físico-químicas mostraram que o óleo de tucumã apresenta características que comprovam que este possui grande potencial energético para a produção do biodiesel, quando comparado com outros óleos vegetais. A substituição parcial do óleo diesel pelo biodiesel de tucumã pode apresentar grande viabilidade socioeconômica tanto na produção, quanto na utilização deste óleo transesterificado em diferentes segmentos da sociedade.

Os ácidos graxos contidos no óleo de tucumã foram determinados na forma de seus respectivos ésteres metílicos, utilizando a técnica de cromatografia gasosa com detecção de massas.

Os ésteres metílicos foram preparados usando o método descrito no International Olive Oil Council (2001). Esse método descreve a obtenção dos ésteres metílicos a partir da transesterificação a frio do óleo de tucumã com uma solução metanólica na presença hidróxido de potássio. As amostras de óleo foram usadas sem qualquer tratamento, a não ser a dissolução em hexano. Os reagentes utilizados para a extração do óleo foram hexano com grau cromatográfico e hidróxido de potássio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ .

Em um tubo de ensaio, pesou-se aproximadamente,  $0,1 \text{ g}$  do óleo. Adicionaram-se  $2,0 \text{ mL}$  de hexano e  $0,2 \text{ mL}$  da solução de  $\text{KOH } 0,2 \text{ mol L}^{-1}$  em metanol. A mistura foi agitada vigorosamente, seguida por repouso e separação. Após separação, uma alíquota de  $1,0 \text{ mL}$  da fase hexânica foi removida e dissolvida em  $1,0 \text{ mL}$  de hexano. Após este tratamento, a amostra encontra-se apta para análise por cromatografia a gás, sendo que essa determinação tem de ser feita dentro de um período máximo de 15 horas.

A separação dos ésteres dos ácidos graxos foi feita em um cromatógrafo a gás da Varian 3800 com uma coluna capilar da Supelco SPB-5 ( $60 \text{ m} \times 0,25$

mm diâmetro interno x 0,2 µm filme) e injetor automático Varian 8200. A temperatura da coluna foi programada em 165°C por 10 minutos, então aumentada para 200°C em 2°C por minuto com um período de isoterma final de 13 min. Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo constante de 1,2 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura do injetor foi fixada em 245°C, com uma razão de 1:50. Utilizou-se modo de ionização positivo com energia de 70 eV em *full scan* e intervalo de aquisição de massas de 35 a 650 dáltons. As análises dos dados foram feitas usando Star Workstation Chromatography software versão 4.51.

A identificação dos ésteres dos ácidos graxos foi feita pela comparação dos espectros obtidos com aqueles contidos no banco de dados do equipamento, NIST 98, e foram considerados apenas aqueles que possuíam um índice de similaridade maior ou igual a 95%. Os erros relativos foram menores do que 1% em todos os níveis de concentração (Haiyan et al., 2007; Torres; Maestri, 2006).

As amostras dos frutos de tucumã foram coletadas como descrito anteriormente e destes foram selecionados, ao acaso, trinta frutos em estágio de amadurecimento e/ou maduros. Os trinta frutos foram separados em oito grupos, com o intuito de verificar se a provável diferença dos elementos químicos presentes no solo de cada área na qual os frutos do tucumã foram coletados iria resultar em diferentes ácidos graxos e/ou quantidades de ácidos graxos presentes no óleo do fruto. Os oito grupos foram nomeados A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>9</sub>; A<sub>6</sub>A<sub>8</sub>A<sub>10</sub>; A<sub>12</sub>A<sub>17</sub>; A<sub>19</sub>A<sub>11</sub>A<sub>8</sub>; A<sub>19</sub>A<sub>21</sub>A<sub>23</sub>A<sub>25</sub>; A<sub>26</sub>A<sub>29</sub>A<sub>30</sub>; A<sub>28</sub>A<sub>27</sub>; A<sub>31</sub>A<sub>32</sub>A<sub>34</sub>A<sub>35</sub>.

As oito amostras dos óleos de tucumã foram submetidas, individualmente, ao processo de extração para posterior análise dos ácidos graxos contidos em cada óleo, por cromatografia a gás com detector de massas. A extração dos ácidos graxos foi realizada seguindo procedimento descrito pelo International Olive Oil Council (2001).

A Figura 13.4 mostra o cromatograma obtido após 40 minutos referente à amostra A<sub>12</sub>A<sub>17</sub>, uma das oito amostras do óleo de tucumã. Observa-se a presença de onze ácidos graxos de acordo com o tempo de retenção de cada um deles. Ainda nessa figura, é possível observar que também existem três picos prioritários nos tempos de retenção de 16,414 minutos, 24,215 minutos e 25,338 minutos. A identificação de cada pico, de acordo com seu respectivo tempo de retenção, pode ser visualizada na Tabela 13.3.



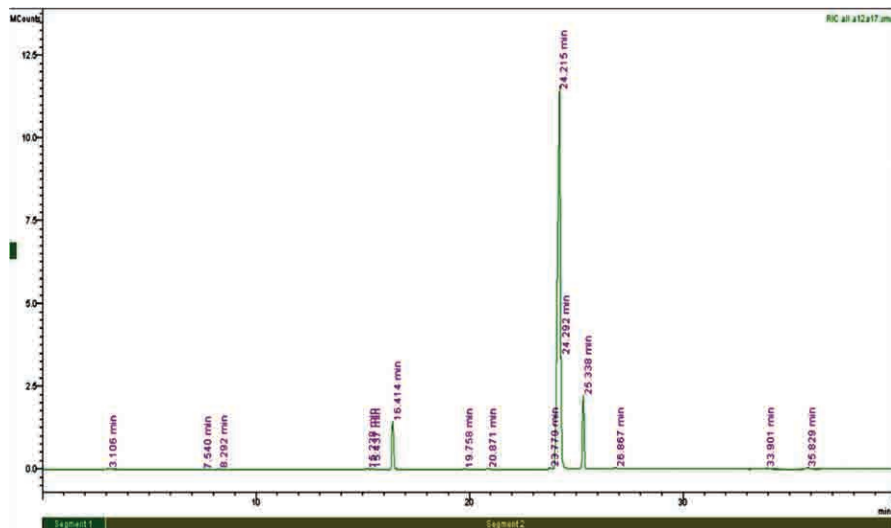


Figura 13.4 – Cromatograma da amostra  $A_{12}A_{17}$ , utilizando uma coluna capilar da Supelco SPB-5 e um detector de espectrômetro de massas.

Tabela 13.3 – Identificação dos ésteres correspondentes aos ácidos graxos presentes no óleo de Tucumã

Tempo de retenção	Ésteres correspondentes aos ácidos graxos
7,544	Éster metílico do ácido hexadecadienoico
8,392	Éster metílico do ácido nonadecanoico
15,252	Éster metílico do ácido-(Z)-hexadec-7-enoico
16,428	Éster metílico do ácido hexadecanoico
20,889	Éster metílico-15-metil do ácido hexadecanoico
23,787	Éster metílico do ácido-octadeca-8,11-dienóico
24,296	Éster metílico do ácido-octadec-8-enoico
25,338	Éster metílico do ácido 14-metil-heptadecanoico
26,873	Éster metílico do ácido octadeca-9,12,15-trienoico
33,925	Éster metílico do ácido eicos-11-enoico
35,849	Éster metílico do ácido eicosenoico

O Gráfico 13.4 mostra a área do pico para as oito amostras dos óleos de tucumã, bem como os correspondentes ésteres metílicos, determinados através do tempo de retenção dos cromatogramas e correspondentes espectros de massas. Nesse gráfico, é possível observar que o óleo do tucumã possui três ésteres predominantes, nas oito amostras estudadas, o éster metílico

do ácido hexadecanoico, o éster metílico do ácido-octadec-8-enoico e o éster metílico do ácido 14-metil-heptadecanoico. Os demais ésteres metílicos presentes nas oito amostras estudadas aparecem em quantidades menores.

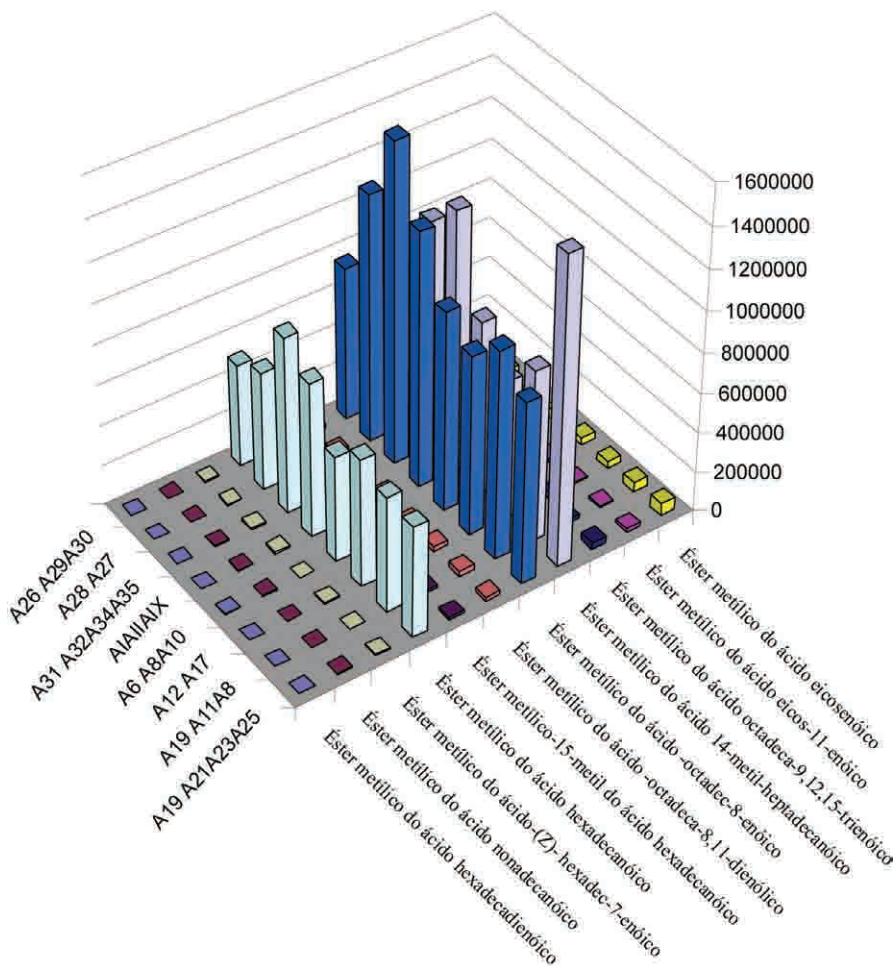


Gráfico 13.4 – Gráfico da área do pico para as oito amostras dos óleos de Tucumã.

Efetuada-se o cálculo da correlação das oito amostras, utilizando como variáveis os tempos de retenção e as áreas de cada um dos ésteres metílicos, o Software Statistica e, de acordo com os resultados, concluiu-se que as oito amostras são estatisticamente idênticas, pois possuem um grau de correlação maior que 0,85 numa escala de 0 a 1.

Realizou-se, também, análise hierárquica por *cluster* (HCA), a qual estabeleceu quais as localidades possuíam maior similaridade, e de acordo com a Figura 13.5, nota-se que, apesar da grande correlação existente entre os locais de coleta pela análise de HCA, foi possível realizar uma diferenciação mais sensível das amostras e percebe-se a formação de dois grupos distintos, em vermelho e amarelo, sendo notório que as amostras em amarelo diferenciaram-se principalmente pela presença de maiores concentrações do éster metílico do ácido 14-metil-heptadecanoico, o que pode ser evidenciado ao realizar a análise do Gráfico 13.4. Porém, tal diferença não contribuiu significativamente para discriminar as amostras, portanto as oito amostras são consideradas similares.

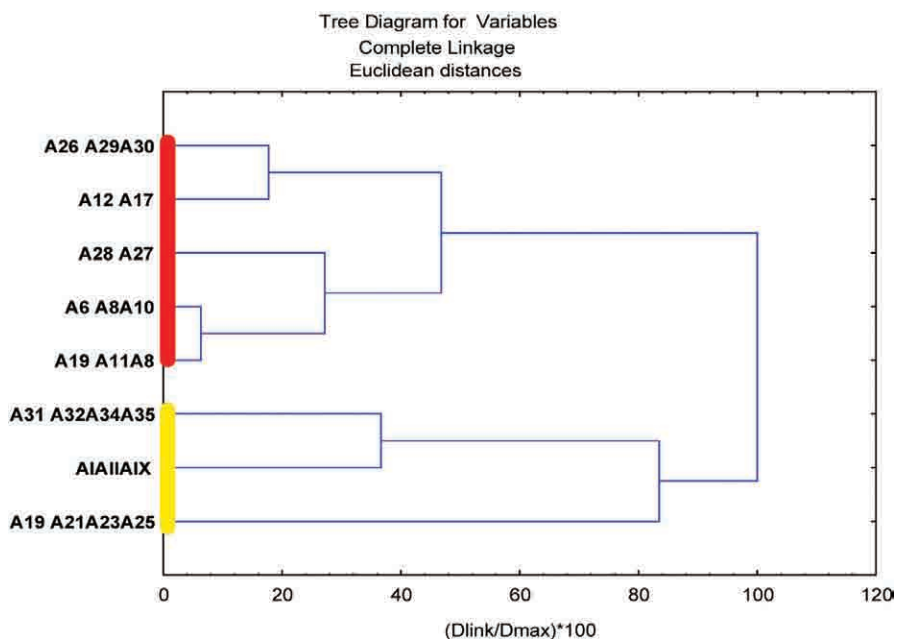


Figura 13.5 – Correlação para as oito amostras dos óleos de Tucumã coletadas em diferentes regiões.

A análise dos cromatogramas e de seus respectivos espectros de massas obtidos para as oito amostras estudadas mostraram que, independente do ponto de coleta, os óleos obtidos a partir dos frutos do tucumã apresentaram similaridade com relação aos quimiotipos.

## Produção de biodiesel metílico e etílico do óleo de tucumã

Neste item, será descrita a transesterificação do óleo de tucumã pela rota etílica e metílica, utilizando-se como catalisador KOH, com o objetivo de desenvolver um meio simples para a produção do biodiesel.

O óleo de tucumã foi obtido pela prensagem do fruto inteiro (polpa e amêndoa) em uma prensa mecânica convencional, sendo filtrado através de um tubo de vidro de 1 cm de diâmetro, preenchido com algodão em sua extremidade, para atuar como filtro. As formas metóxido de potássio e etóxido de potássio foram preparadas utilizando hidróxido de potássio p.a., bem como metanol e etanol p.a., da Synth, respectivamente, seguindo um processo experimental semelhante descrito na literatura (Lima et al., 2008). A forma de metóxido foi obtida após a adição de 9,5 g de KOH em 120 ml de metanol sob agitação até a dissolução completa (reação exotérmica). A forma de etóxido também foi obtida após a adição de 9,5 g de KOH em 150 ml de etanol sob agitação até a completa dissolução.

Cada alíquota da mistura do óleo com o respectivo alcóxido (forma metílica e etílica) foi mantida sob agitação a 40°C por 40 minutos. O processo de transesterificação foi monitorado por cromatografia em camada delgada: o desenvolvimento da separação em hexano/acetato de etila (95% / 5%) provoca diminuição da banda do óleo e aumento das faixas de biodiesel com o passar do tempo.

A separação ocorre espontaneamente, após repouso em funil de vidro. Depois da etapa de decantação, cada forma de biodiesel foi separada da fração contendo glicerina e lavada com solução de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A destilação simples a 100°C foi realizada, a fim de remover a água e o álcool a partir de amostras de biodiesel.

As medidas de estabilidade oxidativa foram realizadas utilizando um equipamento Rancimat 873 da Metrohm. O óleo de tucumã e as amostras de biodiesel metílico e etílico foram submetidos a um fluxo de gás de ar 10 L h<sup>-1</sup>, sob um aquecimento contínuo até 110°C ± 0,3°C.

A análise cromatográfica das amostras de biodiesel, óleo original e da glicerina obtidos durante o processo de transesterificação foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás HP, modelo CG 5890, série II, equipado com uma coluna HP1 (100 dimetilpolisiloxano) com 30 m de comprimento e

diâmetro interno de 0,2 mm. A fase móvel consistiu de  $H_2$  e  $N_2$  ( $30\text{ L min}^{-1}$ ) e ar ( $300\text{ L min}^{-1}$ ). O volume da injeção de 0,5 mL foi utilizado em todas as medições. Foi utilizada temperatura do injetor de  $200^\circ\text{C}$ , sendo a análise realizada usando uma rampa de temperatura de 80 a  $200^\circ\text{C}$ . Os espectros de massa dos principais picos cromatográficos foram monitorados em um espectrômetro de massas modelo HP 5988A, acoplado ao cromatógrafo.

As medições espectroscópicas (FT-IR) para todas as espécies estudadas foram registradas em um espectrofotômetro de infravermelho Perkin Elmer, modelo 1430, na faixa espectral de trabalho  $4500 - 450\text{ cm}^{-1}$ .

A rota metílica foi mais eficiente para a produção de biodiesel (75,1%) do que a rota etílica (66,7%). Ambos os resultados permitiram propor esta metodologia como uma rota alternativa para a produção de biodiesel. Os ácidos láurico, mirístico, palmítico e oleico apresentam-se como os principais componentes do óleo de tucumã, no qual foram detectados em um tempo de retenção que varia de 12 a 23 minutos, utilizando a técnica de CG – MS. Os resultados apresentaram valores semelhantes aos relatados na literatura (Oboh, 2009; Lima et al., 2008; Batista et al., 2011).

A produção de biodiesel também foi confirmada pela técnica de FT-IR. Neste caso, foi possível verificar a localização das bandas das carbonilas dos óleos em relação às do biodiesel, da substituição do glicerol pelo radical metoxílico (Lima et al., 2008).

Os estudos do índice de estabilidade oxidativa indicaram perda de estabilidade química para o biodiesel em relação ao óleo original.

Enquanto foi possível observar um tempo de estabilidade 6,13 horas para as amostras de óleo, apenas de 2,90 horas e de 2,80 horas foram observados para o biodiesel metílico e etílico, respectivamente. De acordo com as leis brasileiras (EN 14112, 2003), os índices obtidos para biodiesel neste trabalho estão abaixo dos valores recomendados (6 horas a  $110^\circ\text{C}$ ). A forma de óleo é mais estável, pois é rica em carotenoides.

O tempo de armazenamento difere dos valores da estabilidade oxidativa obtidos, uma vez que não foi produzida etapa de oxidação induzida ou acelerada às amostras, consistindo tão somente no tempo de armazenamento a  $20^\circ\text{C}$ . Neste caso, foi possível observar um tempo de armazenamento de 35 dias para o óleo de tucumã, provavelmente por causa da presença de água na amostra.

Portanto, este trabalho mostrou que a metodologia executada foi bem-sucedida na produção de biodiesel metílico e etílico do óleo de tucumã, utilizando KOH como reagente para a produção de alcóxido. Apesar de ser usado de várias maneiras pelas comunidades locais da Amazônia, o óleo de tucumã também pode ser convertido em sua forma de biodiesel, que consiste em uma rota interessante de produção para o biocombustível e, portanto, contribuindo para a exploração sustentável dessa espécie. Os valores pertinentes aos índices de estabilidade oxidativa e tempo de armazenamento deste óleo indicaram um bom precursor para a produção de biodiesel local.

### Caracterização físico-química do biodiesel de tucumã

As análises do biodiesel de tucumã produzido segundo item descrito anteriormente foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos na A.O.A.C. (1984). Os valores das propriedades físico-químicas deste biodiesel são mostrados na Tabela 13.4.

Tabela 13.4 – Atributos físico-químicos do biodiesel de tucumã

<i>Índices</i>	<i>Unidades</i>	<i>Valores</i>
Acidez	mg KOH g <sup>-1</sup>	1,41 ± 0,04
Iodo	g I <sub>2</sub> 100 g <sup>-1</sup>	98,3 ± 2,47
Peróxido	meq 1000 g <sup>-1</sup>	20,5 ± 1,73
Saponificação	mg KOH g <sup>-1</sup>	208,6 ± 0,12
Densidade	g cm <sup>-3</sup>	0,86 ± 0,00064
Viscosidade	mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	4,56 ± 0,014

A análise do índice de acidez do biodiesel determinado experimentalmente foi de 1,41 ± 0,04 mg KOH g<sup>-1</sup>. O elevado índice de acidez pode estar relacionado com seu estado de conservação. O armazenamento impróprio e processamento insatisfatório são causas da formação de ácidos livres com aumento na acidez do biocombustível.

O biodiesel de tucumã apresentou um índice de iodo, cujo valor foi de 98,3 ± 2,47 g I<sub>2</sub> 10<sup>-2</sup> g<sup>-1</sup>. Esse comportamento pode ser atribuído às insaturações na cadeia carbônica, resultado da presença de ácidos graxos insatura-

dos, principalmente oleico e linoleico. Estes, em virtude das duplas ligações nas cadeias de carbono, são facilmente oxidados, assim sendo, maior a capacidade de absorção do iodo.

O índice de saponificação foi de  $208,6 \pm 0,12$  mg KOH g<sup>-1</sup>. Pelo resultado obtido, o biodiesel de tucumã pode apresentar insaturações, pois o grau de deterioração e estabilidade do biodiesel pode ser afetado e este está relacionado com o peso molecular dos ácidos graxos, uma vez que quanto menor o peso molecular, maior será o índice de saponificação. Dessa forma, o biodiesel de tucumã pode possuir alta proporção de ácidos graxos de baixo peso molecular em sua cadeia.

O resultado obtido para o índice de peróxido foi de  $20,5 \pm 1,73$  meq 10<sup>-3</sup> g<sup>-1</sup>, o que indica que este pode apresentar-se oxidado. Isso pode ter ocorrido em função de reações radicalares capazes de autopropagação, e que dependem do tipo de ação catalítica (temperatura, íons metálicos, radicais livres, pH). No entanto, o biodiesel de tucumã apresentou rancidez oxidativa em função das insaturações em sua cadeia, principalmente ácidos oleico e linoleico, que são facilmente oxidados.

A densidade do biodiesel de tucumã foi de  $0,86 \pm 0,00064$  g cm<sup>-3</sup>. Esse índice indica que o biodiesel de tucumã apresenta insaturações, pois quanto menor for seu peso molecular, mais alto será seu grau de insaturação.

Os valores das medidas de viscosidade do biodiesel de tucumã foram de  $4,56 \pm 0,014$  na temperatura de 24,6°C. Como a viscosidade aumenta com o comprimento das cadeias e com o aumento da insaturação, o biodiesel de tucumã apresentou baixa viscosidade por causa de insaturações presentes nas ligações de carbono de sua estrutura.

A comparação dos valores obtidos para os atributos físico-químicos adotados pela ANP, a EN e a ASTM no documento intitulado White Paper on Internationally Compatible Biofuel Standards para a padronização internacional da qualidade do biodiesel, permite concluir que o biodiesel de tucumã encontra-se, em geral, dentro das especificações preconizadas por estas agências.

Os ácidos graxos do biodiesel de tucumã foram determinados na forma de ésteres, utilizando a técnica de cromatografia a gás com detector de ionização de chama (GC-FID).

A separação dos ésteres dos ácidos graxos foi feita em um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama da Shimadzu GC 17 – A, com um autoinjeter AOC – 20i e coluna capilar da Restec Stabilwax® (30 m de comprimento x 0,25 mm diâmetro externo x 0,25 µm diâmetro interno). O nitrogênio foi usado como gás de arraste com fluxo constante de 1 mL min<sup>-1</sup> e a proporção entre nitrogênio, ar sintético e hidrogênio foi de 1:1:10. A temperatura do detector foi de 260°C e a temperatura do injetor foi de 240°C. A razão de *split* foi de 1:100 e o volume de injeção foi de 1 µL. A rampa de aquecimento da coluna teve início na temperatura de 140°C (5 min.) com rampa de 4°C min<sup>-1</sup> até 240°C com isoterma a 240°C por 10 min.

A identificação dos ésteres dos ácidos graxos foi feita pela comparação dos cromatogramas obtidos com o cromatograma do padrão C4:C24 da Supelco Analytical.

A Figura 13.6 mostra o cromatograma obtido para o biodiesel de tucumã, utilizando a técnica GC-FID. A identificação dos ésteres dos ácidos graxos, que foi feita por comparação dos respectivos tempos de retenção e a porcentagem de ésteres dos ácidos graxos que estão presentes na amostra podem ser visualizados na Tabela 13.5.

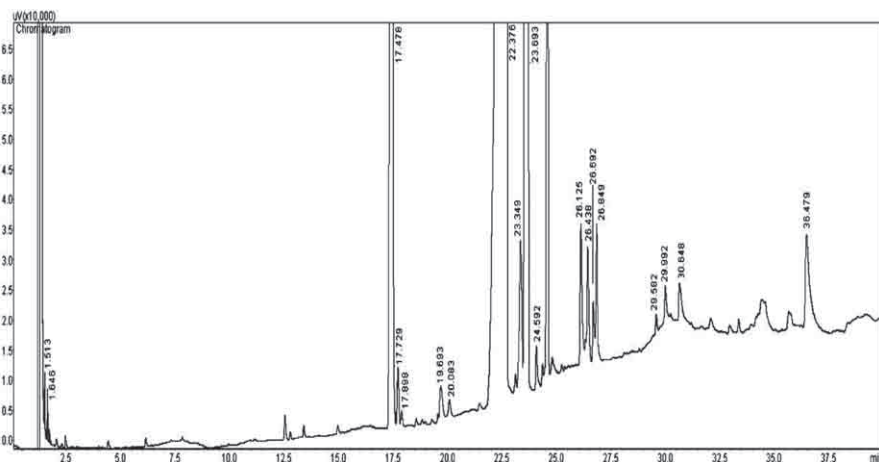


Figura 13.6 – Cromatograma do biodiesel etílico de tucumã, utilizando coluna da Restec Stabilwax® e detector de ionização de chama.



Tabela 13.5 – Porcentagem dos ésteres dos ácidos graxos presentes no biodiesel etílico de tucumã

<i>Éster etílico do ácido graxo correspondente</i>	<i>Número de carbonos e duplas ligações</i>	<i>%</i>	<i>Tempo de retenção (min.)</i>
Butírico	C4:0	0,08	1,646
*N.I.	–	18,34	17,478
*N.I.	–	0,27	17,729
Heptadecanoico	C17:0	0,26	19,693
Oleico	C18:1n:9c	51,01	22,376
Linoleico	C18:2n:6t	25,89	23,693
Cis – 11 – Eicosenoico	–	0,84	26,438
<i>cis</i> -11,14,17-eicosatrienoico	–	0,47	29,582
Arquidônico	–	1,33	30,648
Cis – 4,7,10,13,16,19 - Docosahexaenoico	C22:6n:3	1,50	36,479

\* Não Identificado

Na Tabela 13.5, observa-se que o biodiesel é composto de ésteres de cadeia longa, variando de C4 a C22, sendo que os ésteres etílicos dos ácidos oleico e linoleico representaram as maiores proporções, 51,01%, 25,89%, respectivamente. O biodiesel de tucumã apresentou uma composição de ésteres semelhante aos perfis apresentados em trabalhos descritos na literatura (Zaninetti, 2009; Bittencourt, 2009). As variações percentuais nos teores das amostras podem ser atribuídas a diferentes meios de sua obtenção e de efeitos sazonais e circadianos de diferentes regiões.

A análise cromatográfica do biodiesel de tucumã mostrou que o combustível produzido desta palmácea apresenta-se rico em ésteres etílicos de cadeia longa, podendo ser uma fonte energética viável.

## Utilização do biodiesel de tucumã em trator agrícola

Os ensaios de desempenho foram realizados utilizando-se um trator marca Valtra, modelo BM 125I, 4 x 2 com tração auxiliar (TDA), potência de 91,9 kW (125 cv) no motor a 2.300 rpm (ISO 1585). Neste ensaio, o

trator mostrado na Figura 13.7 foi instrumentado com medidor de combustível conforme descrito por Lopes (2006): célula de carga para medição de força na barra, radar para medir velocidade de deslocamento e sensor de rotação de patinagem das rodas.



Figura 13.7 – Vista geral do trator de ensaio com instrumentação completa

Fonte: Lopes, 2006

Os resultados de desempenho do trator estão apresentados na forma de equações, figuras e tabelas. A síntese da análise estatística foi apresentada para grupos de variáveis nas tabelas 13.6 e 13.7. Nessas tabelas, os dados referentes às misturas representam médias de vinte e quatro observações.

Tabela 13.6 — Síntese da análise de variância e teste de médias para as variáveis de patinagem média dos rodados, velocidade de deslocamento (V) e potência na barra de tração (PB)

<i>Proporção de biodiesel (%)</i>	<i>Patinagem (%)</i>	<i>V (km h<sup>-1</sup>)</i>	<i>PB (kW)</i>
B0	9,20 a	5,34 a	37,77 a
B5	9,25 a	5,35 a	38,37 a
B25	9,27 a	5,35 a	39,08 a
B50	9,25 a	5,35 a	38,02 a
B75	9,27 a	5,37 a	37,85 a
B100	9,25 a	5,37 a	38,62 a
C.V.%	0,52	0,21	3,62
Média	9,24	5,35	38,28

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. C.V.: coeficiente de variação.

Verifica-se, na Tabela 13.6, que o fator misturas de biodiesel de tucumã no diesel não influenciou na patinagem dos rodados. Registra-se que o valor médio de 9,24% encontra-se dentro dos limites recomendados pela American Society of Agricultural Engineers (1989). Na referida recomendação, é previsto que, se a patinagem for muito baixa, pode ser indicio de lastragem excessiva do trator ou exigência de força abaixo do ideal. Da mesma forma, quando a patinagem é além da recomendada, pode ser falta de lastragem ou exigência de força acima da prevista para o trator. É importante destacar que a ocorrência de ambos os casos se constitui em fator negativo, pois, no primeiro caso, o trator é subutilizado; e no segundo, ocorre desgaste acelerado do conjunto, levando a quebras prematuras, principalmente em função dos picos de força frequentes em operações agrícolas.

As proporções de mistura não influenciaram a velocidade de deslocamento do trator. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Soranso et al. (2008), trabalhando com biodiesel de óleo residual, com força média na barra de tração de 20 kN.

As proporções de mistura de biodiesel de tucumã no diesel não influenciaram a potência na barra de tração, cuja média foi de 38,28 kW. Esse comportamento é explicado em função de a referida variável ser o produto da força mantida próxima a 25 kN com a velocidade que, no caso concreto, também não apresentou variação disponível na barra de tração, pois a forma de compensação do menor poder calorífico do biodiesel é o aumento

no consumo de combustível para que a potência na barra de tração não seja comprometida.

Na Tabela 13.7, encontram-se a síntese da análise de variância e o teste de médias para as variáveis consumo horário volumétrico, consumo horário ponderal e consumo específico.

Tabela 13.7 — Síntese da análise de variância e teste de médias para as variáveis de consumo horário volumétrico (Chv), consumo horário ponderal (Chp), consumo específico (Ce) e opacidade da fumaça

<i>Proporção de biodiesel (%)</i>	<i>Chv (L h<sup>-1</sup>)</i>	<i>Chp (kg h<sup>-1</sup>)</i>	<i>Ce (g kWh<sup>-1</sup>)</i>	<i>Opacidade (m<sup>-1</sup>)</i>
B0	13,0 a	10,9 a	291,6 a	1,35 a
B5	13,3 a	11,1 a	288,6 a	1,22 b
B25	13,7 ab	11,5 ab	287,8 a	1,17 b
B50	14,1 bc	11,8 bc	314,6 b	1,07 c
B75	14,6 cd	12,4 cd	330,2 c	0,86 d
B100	15,0 d	12,9 d	340,3 c	0,54 e
C.V.%	2,43	2,51	1,75	5,50
Média	13,95	11,7	308,8	1,03

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C.V.: coeficiente de variação.

Na Tabela 13.6, observa-se que a proporção de biodiesel de tucumã misturado ao diesel, ao comparar B0 e B100, aumentou o consumo em 15,4%. Esse aumento é função do menor poder calorífico do biodiesel em relação ao diesel, tornando-se necessário utilizar maior quantidade de combustível para realizar a mesma quantidade de trabalho. Nota-se ainda que, a partir de B25, ocorre acréscimo no consumo volumétrico, com este sendo semelhante ao B5 e B0, sendo B25 semelhante ao B50 e esse inferior ao B100. Os resultados do presente trabalho condizem com os encontrados por Camara (2009), ressaltando que esse funcionou o trator com biodiesel de óleo residual. A importância de apresentar o consumo horário na forma volumétrica é que tal informação atende diretamente os agricultores, assim como todos aqueles sem acesso às medidas obtidas de formas mais precisas.

Em relação ao consumo horário ponderal, nota-se que o consumo ponderal foi semelhante entre as proporções B0 e B5, com B5 sendo semelhante ao B25, enquanto o B25 também foi semelhante ao B50, sendo B75 e B100

os que proporcionaram maior consumo. Comparando-se B0 a B100, observa-se acréscimo de 18,3% no consumo. Destaca-se que o consumo ponderal é a forma mais utilizada pelas distribuidoras de combustíveis líquidos, pois assim é considerado o efeito da temperatura na variação do volume.

Verifica-se que para o consumo específico não ocorreu diferença significativa até a adição de 50% de biodiesel (B50). Todavia, comparando o B0 com o B100, o consumo aumentou 16,7%. Esse aumento deve-se ao menor poder calorífico do biodiesel em relação ao diesel. A importância de expressar o consumo de combustível na forma de específico é atender à comunidade científica e também a fabricantes de tratores e motores, pois, na referida modalidade, leva-se em consideração o volume de combustível, sua densidade e a potência aproveitada na barra de tração. Por este motivo, tal forma é a maneira mais recomendada para comparar tratamentos.

O comportamento do consumo específico em função da proporção de mistura de biodiesel de tucumã no diesel foi ajustado a um modelo linear de regressão e está ilustrado no Gráfico 13.5.

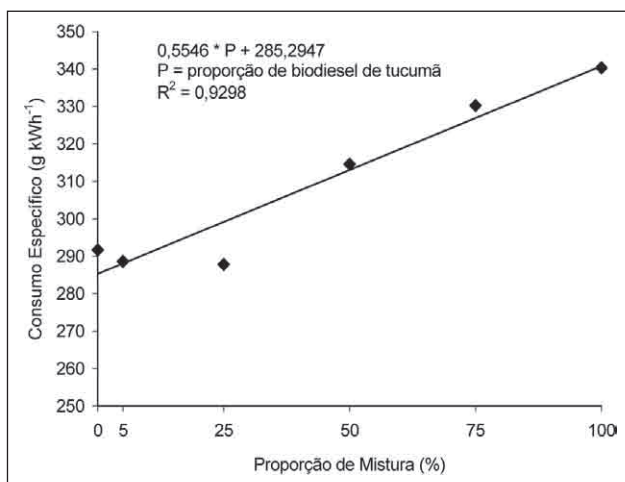


Gráfico 13.5 – Ajuste de modelo linear de regressão que explica o consumo específico em função da proporção da mistura de biodiesel de tucumã e diesel.

Os ensaios de opacidade da fumaça foram realizados em condição estática, utilizando-se um trator marca Valtra, modelo BM 100, 4 x 2 com tração auxiliar (TDA), potência de 73,6 kW (100 cv) no motor a 2.300 rpm (ISO 1585). Neste ensaio, o referido trator foi instrumentado com opacímetro

TM 133 para medir opacidade, tacômetro universal TM 525/2 para aferir a rotação do motor, sonda coletora de fumaça e controlador serial TM 616 que serve como interface entre sensores e trator. Neste ensaio, utilizou-se de biodiesel etílico filtrado de tucumã. A ilustração do trator instrumentado para o ensaio de opacidade encontra-se na Figura 13.8.



Figura 13.8 – Vista geral do trator instrumentado para o ensaio de opacidade da fumaça.

Na Tabela 13.7, encontram-se os resultados da opacidade da fumaça. Verifica-se que, em função da proporção de mistura, houve redução significativa da opacidade da fumaça com o acréscimo de biodiesel à mistura, mesmo em pequenas quantidades, conforme observado na proporção B5, atingindo melhoria de 60%, comparando B100 com B0. Esse fato é em função de menor emissão de material particulado, quando se utiliza biodiesel. Resultados semelhantes também foram observados por Mazziero et al. (2006) e Camara (2009). O comportamento da opacidade da fumaça em função da proporção de mistura foi linear, conforme é mostrado no Gráfico 13.6.

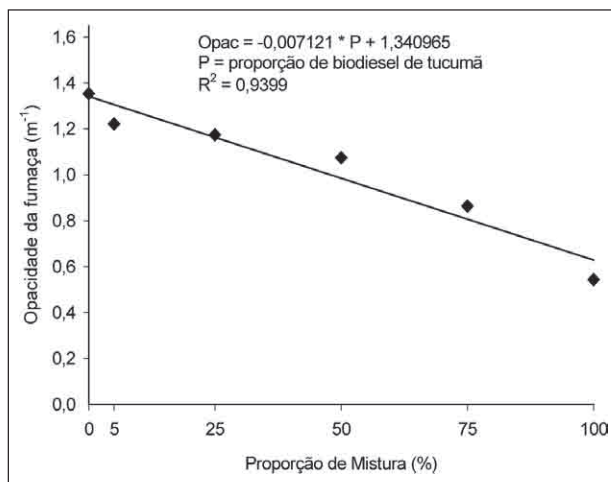


Gráfico 13.6 – Ajuste de modelo de regressão que explica a opacidade da fumaça em função da proporção da mistura de biodiesel de tucumã e diesel.

Os dados obtidos experimentalmente indicam que o consumo de combustível aumenta quando comparado o biodiesel de tucumã com o diesel de petróleo, e isso se dá por causa de menor poder calorífico do tucumã. No entanto, o biodiesel de tucumã apresentou menor opacidade na fumaça, conseqüentemente menor emissão de material particulado.

## Produção de bio-óleo da torta de tucumã por pirólise rápida

A produção do biodiesel inicia-se com a prensagem da matéria-prima para a obtenção do óleo bruto, tendo como rejeito a torta. Hoje, um dos grandes desafios do Sistema Agroindustrial do biodiesel é a agregação de valor aos resíduos.

Atualmente, as tortas provenientes do processo de produção do biodiesel são empregadas como adubo ou complemento alimentar de animais (ração). A alternativa energética hoje existente para esse resíduo é a queima (combustão). Assim, estudos visando novas utilizações dessas tortas contribuirão para a sustentabilidade do processo produtivo de biocombustíveis.

A composição química da torta de tucumã foi determinada, utilizando um equipamento Elementar Vario Micro Cube. Para esta análise, foi utilizado o método de combustão para converter os elementos da amostra em

gases simples como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{N}_2$ , em que a amostra foi oxidada em uma atmosfera de oxigênio puro. Os gases foram separados, detectados em função de sua condutividade térmica e convertidos em porcentagem de C, H e N na amostra. O teor de oxigênio foi obtido por diferença. Os resultados encontram-se na Tabela 13.8.

Tabela 13.8 – Composição elementar da torta de tucumã

<i>Constituintes</i>	<i>Composição elementar (%)</i>
Carbono	51,87
Oxigênio	38,86*
Hidrogênio	6,86
Nitrogênio	1,92
Enxofre	0,49

\*Valor obtido por diferença

Os dados apresentados na Tabela 13.8 mostram que a torta de tucumã possui um alto teor de oxigênio em sua composição e um baixo teor de enxofre. Estes valores estão de acordo com os encontrados para biomassas (Raveendran et al., 1996).

O bio-óleo da torta de tucumã foi produzido por meio de pirólise rápida, utilizando-se um reator de leito fluidizado, com os seguintes parâmetros de operação: temperatura de pirólise ( $600^\circ\text{C}$  e  $700^\circ\text{C}$ ), taxa de aquecimento ( $10^\circ\text{C min}^{-1}$ ), tamanho de partícula (35-60 mesh), taxa de alimentação do reator ( $1,50 \text{ g min}^{-1}$ ), vazão do gás de arraste ( $170 \text{ mL min}^{-1}$ ).

O líquido obtido a partir da pirólise era composto de uma fase aquosa e uma fase orgânica. A fase aquosa foi fracionada em três grupos: extrativos, compostos polares de baixo peso molecular e subfrações e compostos apolares de alto peso molecular. A quantidade de extrativos foi determinada por solubilidade em hexano. A mistura óleo e hexano (1:5) foi agitada por 10 minutos e separada por decantação.

A fração insolúvel em hexano foi esterificada, seguindo o método descrito por Hartman e Lago, 1973. Após a esterificação, foram obtidas as frações de compostos solúveis em metanol, referentes a moléculas polares de baixo peso molecular e subfrações e as insolúveis em metanol, referentes aos compostos apolares de alto peso molecular.

As frações obtidas foram analisadas e identificadas por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massa (GC-MS) em um equipamento Shimadzu CG-2010.



Para análise das frações solúveis em hexano, utilizou-se de uma coluna capilar DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) nas seguintes condições: temperatura inicial de 40°C (3 min), aquecimento a uma taxa de 7°C min<sup>-1</sup> até 180°C e de 15°C min<sup>-1</sup> até 270°C, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto (tempo total de corrida 30 min); temperatura do injetor: 220°C; temperatura da interface: 240°C; temperatura da fonte de íons: 200°C; gás carreador hélio (1,21 mL min<sup>-1</sup>); taxa de *split* 1:10 e volume injetado de 1  $\mu\text{L}$ .

Para a análise das frações solúveis em metanol, utilizou-se da coluna capilar DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) nas seguintes condições: temperatura inicial 35°C (4 min); aquecimento a uma taxa de 5°C min<sup>-1</sup> até 60°C (2 min), 6°C min<sup>-1</sup> até 240°C e 10°C min<sup>-1</sup> até 270°C (5 min) com tempo total da corrida de 49 minutos; temperatura do injetor: 270°C; temperatura da interface: 240°C; temperatura da fonte de íons: 200°C; gás carreador hélio (1,19 mL min<sup>-1</sup>); taxa de *split* 1:10 e volume injetado de 1  $\mu\text{L}$ .

O detector de massas, para ambas as frações, operou com ionização por impacto de elétrons de 70 eV e varredura de massas entre os intervalos de 45 a 500 Da. A identificação dos compostos foi feita com biblioteca especializada, contendo mais de 240 mil espectros (Wiley).

Um dos parâmetros mais importante na pirólise é a temperatura. Assim testaram-se duas temperaturas, 600°C e 700°C. Em temperaturas inferiores a 600°C, a quantidade de alcatrão (moléculas pesadas) é superior a 90%, e em temperaturas superiores a 700°C, aumenta a fração gasosa e reduz o rendimento de bio-óleo.

Os balanços de massa dos produtos obtidos da pirólise rápida da torta de tucumã encontram-se na Tabela 13.9.

Tabela 13.9 – Balanço de massa dos produtos obtidos pela pirólise rápida da torta de tucumã.

Temperatura	600°C	700°C
Massa total de biomassa (g)	150,00	150,00
Massa total de carvão produzido (g)	37,00	29,00
Massa total de líquido produzido (g)*	18,70	14,05
0,5 hora	1,77	3,79
1 hora	3,79	1,11
2 horas	3,62	3,33
3 horas	9,50	5,76
Massa total de gases produzidos (g)*	94,30	107,00

\*teor de gás obtido por diferença

Nota-se que a influência da temperatura final sobre o rendimento de todos os produtos da pirólise da torta de tucumã variou significativamente. A 600°C, obteve-se um rendimento maior de líquido e um menor rendimento de gás. A produção de sólidos diminuiu com o aumento da temperatura. Dessa forma, a melhor temperatura de pirólise para produção de bio-óleo de torta de tucumã foi 600°C.

A caracterização química completa do bio-óleo é difícil, por se tratar de uma mistura complexa de diversos compostos, frequentemente em pequenas quantidades, e de conter compostos de alto peso molecular resultantes da decomposição da celulose, hemiceluloses e lignina. Cerca de 40% do bio-óleo pode ser detectado via GC-MS e os compostos polares e não voláteis podem ser analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Moham et al., 2006).

Os compostos constituintes da fração aquosa do bio-óleo foram identificados e quantificados por GC-MS. Foram avaliadas as frações solúveis em hexano e as frações esterificadas. Os resultados para o bio-óleo produzido a 600°C e 700°C encontram-se nas Tabelas 13.10 e 13.11, respectivamente.

Os resultados das Tabelas 13.10 e 13.11 mostram que as frações solúveis em hexano das frações aquosas dos bio-óleos obtidas a 600°C e 700°C apresentaram composições significativamente diferentes: a primeira é rica em hidrocarbonetos, enquanto a segunda, em compostos oxigenados. Já as

Tabela 13.10 – Composição da fração aquosa do bio-óleo da torta de tucumã obtido por pirólise a 600°C

<i>Grupo</i>	<i>Fração solúvel em hexano (%)</i>	<i>Fração esterificada solúvel em hexano (%)</i>	<i>Fração esterificada solúvel em metanol (%)</i>
Parafina	64,41	55,64	8,48
Olefina	1,60	0,89	0,20
Aromático	14,44	37,09	< LD**
Acetona	1,55	< LD**	< LD**
Ácido	3,16	< LD**	1,70
Álcool	5,53	0,38	5,59
Aldeído	0,09	< LD**	31,37
Éster	1,15	2,61	34,36
Éter	0,25	3,11	< LD**
NI*	7,62	0,28	18,30

\* Não identificado

\*\* Menor que o limite de detecção

Tabela 13.11 – Composição da fração aquosa do bio-óleo da torta de tucumã obtido por pirólise a 700°C

Grupo	Fração solúvel em hexano (%)	Fração esterificada solúvel em hexano (%)	Fração esterificada solúvel em metanol (%)
Parafina	10,29	56,82	0,41
Olefina	0,18	0,10	0,89
Aromático	4,75	33,51	0,40
Ácido	2,77	< LD**	22,08
Álcool	2,27	1,29	< LD**
Éster	53,53	1,17	67,86
Éter	13,72	1,44	< LD**
NI*	12,49	5,67	8,36

\* Não identificado

\*\* Menor que o limite de detecção

frações esterificadas apresentaram composições semelhantes: as solúveis em hexano eram ricas em hidrocarbonetos, e as solúveis em metanol, ricas em compostos oxigenados.

O bio-óleo produzido a partir da pirólise rápida da torta de tucumã mostrou-se uma alternativa energética viável, uma vez que a biomassa vegetal é a única fonte de combustível alternativa aos combustíveis fósseis.

## Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho mostram a coleta manual dos frutos de tucumã, a extração mecânica do respectivo óleo, a caracterização físico-química do óleo extraído, a produção do biodiesel de tucumã, utilizando reação de transesterificação com etanol e metanol, a caracterização físico-química do biodiesel produzido e a utilização deste biodiesel em tratores agrícolas.

Os estudos da coleta dos frutos e da extração do óleo de tucumã mostraram que os locais de amostragem influenciaram na quantidade de lipídeos totais na amêndoa e na polpa do tucumã, assim como no rendimento aparente da prensa.

As análises físico-químicas mostraram que o óleo de tucumã apresenta características que comprovaram que o mesmo possui um grande potencial

energético para a produção do biodiesel quando comparados com óleos extraídos de outras espécies oleaginosas.

A metodologia proposta para a produção de biodiesel etílico a partir do óleo de tucumã, utilizando KOH como reagente para a produção de alcóxido, foi bem sucedida. Os valores pertinentes aos índices de estabilidade oxidativa e tempo de armazenamento deste óleo indicaram ser o mesmo bom precursor para a produção de biodiesel.

As análises físico-químicas do biodiesel de tucumã mostraram que o combustível produzido desta oleaginosa apresenta-se rico em ésteres metílicos de cadeia longa, podendo ser uma fonte energética viável.

A utilização do biodiesel de tucumã em tratores agrícolas mostrou que, apesar do consumo ser maior, quando comparado ao diesel de petróleo, o biodiesel de tucumã apresenta menor opacidade na fumaça e, conseqüentemente, menor emissão de material particulado.

O bio-óleo produzido a partir da pirólise rápida da torta de tucumã mostrou-se uma alternativa energética viável, pois apresenta-se rico em hidrocarbonetos e compostos oxigenados, agregando valor ao coproduto gerado no processo produtivo do biodiesel, o que pode tornar o processo mais sustentável.

Os resultados obtidos nas diversas etapas desta pesquisa mostraram a viabilidade técnica para geração de uma cadeia produtiva de biodiesel de tucumã, a qual apresenta um meio sustentável de suprir as necessidades energéticas além de um crescimento socioeconômico.

## Referências bibliográficas

- AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS. Agricultural tractor test code. In: *ASAE standards 1989: Standards engineering practices data*. St. Joseph, 1989. p.44-8. (ASAE S209.5).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of the Association of official analytical chemists*. 14<sup>th</sup> ed. Washington, Dc.: Williams Horwitz. 1984. p.1141.
- BATISTA, A. C. F. et al. A Simple and Fast Method for the Production and Characterization of Methylc and Ethylic Biodiesels from Tucum Oil via an Alkaline Route, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011, Article ID 238474, 4 pages. DOI:10.1155/2011/238474, 2011.

- BITTENCOURT, R. M. *Extração de ácidos graxos da semente do Tucumã Açú*. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.
- CAMARA, F. T. *Biodiesel de dendê em trator agrícola: desempenho em função do tempo de armazenamento e da proporção de mistura na operação de preparo do solo*. 2009. 92f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2009.
- CASTRO, J. C.; SILVA, L. P.; BARRETO, A. C. Produção sustentável de biodiesel a partir de oleaginosas amazônicas em comunidades isoladas. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1, 2006, Brasília/DF. *Anais...*, v.1, p.285-9, 2006.
- CORREIA, J. C. Atendimento energético a pequenas comunidades isoladas: barreiras e possibilidades. *T&C Amazônia*, 6, p.30-5, 2005.
- DEMIRBAS, A. Biodiesel fuel from vegetable oil via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterification and other methods: a survey. *Energy Conversion and Management*. p.2093-109, 2003.
- EN 14112:2003 – *Fat and Oil Derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of oxidation stability* (accelerated oxidation test), 2003.
- FERREIRA, E. S.; LUCIEN, V. G.; SILVEIRA, C. S. Caracterização física do fruto, análise físico-química do óleo extraído do mesocarpo do tucumã (*Astrocaryum vulgare Mart.*) e Inajá (*Maximiliana regia Mart.*). CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2, *Anais...*, Varginha/MG, 2005.
- FIGLIUOLO, R.; SILVA, J. D.; COSTA, M. S. T. A. Produção de Biodiesel na Cadeia Produtiva e Sustentável do Tucumã do Amazonas (*Astrocaryum aculeatum G.F.W. Meyer*) (*Arecacea*, palmeira). In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2, Brasília/DF. *Anais...*, p.73-3, 2007.
- FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. O. *Agronegócio da mamona no Brasil*. Comunicação para transferência de tecnologia, p.295-335, 2001.
- HAIYAN, Z. et al. *Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles on selected oils*. *Food Chemistry*, v.100, p.1544-51, 2007.
- HARTMAN, L.; LAGO, B. C. Rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, London, v.22, p.475-7, 1973.
- HOLANDA, A. *Biodiesel e Inclusão Social*. Brasília, 2004.
- INTERNATIONAL OIL COUNCIL, COI/T.20/DOC no. 24, 2001 < <http://www.internationaloliveoil.org/>>
- LIMA J. R. O. et al. Biodiesel of tucum oil, synthesized by methanolic and ethanolic routes. *Fuel* 87. p.1718-23, 2008.
- LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quim. Nov.* v.32, n.6, 2009.

- LOPES, A. *Biodiesel em trator agrícola: desempenho e opacidade*. Jaboticabal, 2006. 157 f. Tese (Livre docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.
- LORENZI, H. SOUZA, H. M. et al. *Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas*. Instituto Plantarum, 432p., 2004.
- MALACRIDA, C. R. Alterações do óleo de soja e da mistura azeite de dendê: óleo de soja em frituras descontínuas de batatas chips. *Braz. J. Food Technol.* v.6, n.2, p.245-9, 2003.
- MAZZIERO, J. V. G. et al. Avaliação de emissões poluentes de um motor diesel utilizando biodiesel de girassol como combustível. *Engenharia na Agricultura*, São Paulo, v.14, n.4, p.287- 92, 2006.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br>>. Acesso em: 15 set. 2008.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Leilão de Biodiesel Garantirá Mistura de B5 no 1º Semestre de 2011. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br>>. Acesso em: 3 dez. 2010.
- MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. *Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review*, v.20, p.848-89, 2006.
- MORETTO, E.; FETT, R. *Definição de óleos e gorduras tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*. São Paulo: Varela, 144p., 1998.
- NASCIMENTO, J. F.; FERREIRA, E. J. L.; REGIANI, A. M. Parâmetros biométricos dos cachos, frutos e sementes da palmeira tucumã (*Astrocaryum aculeatum* g. Meyer), no estado do Acre, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 5, 2007, Guarapari, ES. *Revista Brasileira de Agroecologia*. Associação Brasileira de Agroecologia, Porto Alegre, v.2, p.1314-18, 2007.
- OBOH, F. O. J. The oleochemical potential of tucum (*Astrocaryum vulgare* Mart) pulp oil and stearin. *Riv. It. Delle Sost Grasse* 86. p.39-47, 2009.
- OMACHI, I. H. et al. Produção de biomassa florestal para exportação: o caso da AMCEL. *Biomassa & Energia /Rede Nacional de Biomassa para Energia – Viçosa: Renabio: UFV*, v.1, n.1, p.29-36, 2004.
- PANTOJA, N. V. et al. Estudo da viabilidade do uso dos frutos da palmeira tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. Meyer) para a extração de óleo e síntese de biodiesel. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 57, *Anais...* Gramado/RS, 2006.
- PARENTE, E. J. S. Biodiesel no plural. In: *O Futuro da Indústria: Biodiesel*. Coletânea de Artigos, Série Política Industrial, Tecnológica e de Comércio Exterior, 14, p.91-104, Brasília/DF: 2006.
- PEREIRA JR. et al. Energy in Brazil: Toward sustainable development? *Energy Policy*, 36(1). p.73-83, 2008.
- PESCE, C. *Oleaginosas da Amazônia*. Museu Paraense Emílio Goeldi, Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural, Belém, 2009.
- QUADRELLI, R.; PETERSON, S. The energy-climate challenge: recent trends in CO<sub>2</sub> emissions from fuel combustion. *Energy Policy*, 35(11). p.5938-52, 2007.

- RAVEENDRAN, K.; GANESH, A.; KHILAR, K. C. *Pyrolysis characteristics of biomass and biomass components. Fuel*, v.75, n.8, p.987-98, 1996.
- SANTOS, R. F. dos et al. Análise Econômica. In: AZEVEDO, D. M. P. de.; LIMA, E. F. (Eds.). *O agronegócio da mamona no Brasil*: Embrapa-SPI, p.17-35. 2001.
- SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 199-210, 1998.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quím. Nova* [on-line], v.22, n.1, p.94-103.
- SORANSO, A. M. et al. Desempenho dinâmico de um trator agrícola utilizando biodiesel destilado de óleo residual. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v.12, n.5, p.553-9, 2008.
- TORRES, M. M.; MAESTRI, D. M. The effects of genotype and extraction methods on chemical composition of virgin olive oils from Traslasierra Valley (Córdoba, Argentina). *Food Chemistry*, 96, p.507-11, 2006.
- ZANINETTI, R. A. *Caracterização do óleo de frutos de tucumã (Astrocaryum Aculeatum) para a produção de biodiesel*. Jaboticabal, 2009. Dissertação (Mestrado). Unesp.

## 14

# Contaminação microbiana na fermentação alcoólica para produção de etanol carburante

*Pedro de Oliva-Neto, Karin M. Ludwig, Claudia Dorta, Ana Flavia A. Carvalho, Douglas F. da Silva, Valéria M. G. Lima*

### Introdução

O processo de produção de etanol carburante no Brasil é feito pela fermentação alcoólica de caldo de cana e/ou derivados por meio da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por uma derivação do processo Melle Boinot. Este processo caracteriza-se pelo reciclo de altas concentrações de células de levedura, por meio de centrífugas, onde a fermentação é processada mais rapidamente e de forma mais eficiente do que nos processos mais antigos utilizados no Brasil. Tal processo não é asséptico e com o reciclo das leveduras, ocorre também o reciclo de microrganismos contaminantes, destacando-se leveduras inclusive de outros gêneros, e bactérias, as quais podem causar prejuízos com maiores gastos de insumos e queda na eficiência alcoólica. Neste capítulo, é discutida a microbiota da fermentação, os tipos de contaminantes bacterianos e fúngicos, os prejuízos e problemas causados por estes contaminantes, o efeito inibidor de diferentes fatores sobre o metabolismo de *S. cerevisiae* e a relação ecológica entre *S. cerevisiae* e os contaminantes. Finalmente, são abordados os métodos de controle dos contaminantes biológicos da fermentação, desde os mais antigos até os mais atuais.



## Microrganismos contaminantes e sua importância na indústria sucroalcooleira

### Microbiota das destilarias produtoras de etanol

As leveduras e bactérias são os contaminantes mais importantes na cadeia produtiva da produção de etanol carburante, causando perdas de açúcar, produção de ácidos orgânicos e biopolímeros indesejáveis, floculação do fermento. Entre outros problemas, desde a cana cortada até o caldo de cana sendo fermentado.

Dependendo das condições climáticas e do tempo em que a cana fica cortada no campo, exposta ao ataque de insetos e microrganismos, esta contaminação pode atingir níveis de até  $10^9$  UFC/ml (unidades formadoras de colônias/ml de caldo). Segundo Ducan e Colmer (1964), canas saudáveis podem conter  $10^4$  a  $10^8$  bactérias/g, e  $10^3$  a  $10^4$  bolores e leveduras/g. O número de espécies da microbiota contaminante vai sendo restrita, quando se analisa desde a cana intacta até o caldo fermentado, por causa dos fatores limitantes intrínsecos ao processo de produção de etanol.

### Contaminação bacteriana nas destilarias produtoras de etanol

Da cana verde até o caldo de cana fermentado já foram encontradas bactérias dos gêneros *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Aerobacter*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Sporolactobacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Citrobacter*, *Escherichia* e um dos gêneros mais importantes que se mantém ao longo de todo o processo, o *Lactobacillus* (Almeida, 1940; Galli, 1961; Ducan; Colmer, 1964; Bevan; Bond, 1971; Lima et al., 1974; Tilbury, 1975; Rosales, 1989, Gallo, 1989; Olivato-Neto, 1990).

Os primeiros relatos do mapeamento das contaminações da fermentação alcoólica no Brasil foram feitos por Neves (1938), Almeida (1940) e Galli (1961). Estes autores identificaram fermentações paralelas à fermentação alcoólica como responsáveis por muitos transtornos no processamento. Entre elas, destacaram-se: a fermentação acética (*Acetobacter* e *Pseudomonas*), a fermentação butírica (*Clostridium*), e a produção dos biopolímeros dextrana (*Leuconostoc mesenteroides*) e a levana (*Bacillus*, *Aerobacter* e *Streptococcus*).

A partir da cana-de-açúcar, Duncan e Colmer (1964) isolaram os seguintes microrganismos: *Leuconostoc*, *Bacillus subtilis*, *Aerobacter cloacae*, *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas* que foram identificados na cana-de-açúcar intacta. Além disso, *Leuconostoc*, *Xanthomonas* e *Aerobacter* estavam presentes após duas horas do corte mecanizado (Bevan; Bond, 1971). Lima et al. (1974) identificaram em caldo bruto, misto e água de embebição as seguintes bactérias: *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus coagulans*, *B. circulans*, *B. megaterium* e *Pseudomonas incognita*. Estudando a deterioração do caldo de cana, Tilbury (1975) encontrou: *Leuconostoc mesenteroides*, *L. dextranicum* e *Lactobacillus plantarum*.

Segundo Silva (1988), em caldo de cana clarificado e pasteurizado houve um predomínio de *Lactobacillus* (38%), heterofermentativas (98%) e termodúricas (79%). As espécies mais frequentes eram *L. fermentum/reuteri* (47%) seguidas de bactérias pertencentes à família *Micrococcaceae* (23%), *Leuconostoc* (12%), leveduras (12%), *Bacillus* (3%) e membros da família *Enterobacteriaceae*. As espécies mais frequentes de lactobacilos foram: *L. fermentum/reuteri* (47%), *L. confusus* (18%), *L. viridescens* (11%), *L. brevis/buchneri* (4%) e *L. plantarum* (2%).

Rosales (1989) determinou que 45% das bactérias encontradas nas destilarias de etanol (caldo fermentado, mosto e fermento) eram do gênero *Lactobacillus*, seguido de *Leuconostoc mesenteroides* (14,4%).

Gallo (1989) também identificou uma flora predominantemente gram-positiva (98,5%), em forma de bastonetes (85,3%) e não esporulante (73,9%), sendo os gêneros mais frequentes *Lactobacillus* (59,7%) e *Bacillus* (26,6%). Entre as espécies predominantes estavam *L. fermentum* (15%), *B. coagulans*, (15%), *Lactobacillus helveticus* (14%), *B. stearothermophilus* (7%), *L. plantarum* (5,7%), *L. animalis* (4,5%) e *L. buchneri* (3,8%). *Sporolactobacillus inullinus* causou uma grave infecção bacteriana por causa de sua resistência ao tratamento com ácido sulfúrico utilizado no preparo do pé-de-cuba (Serra et al., 1979).

Oliva-Neto (1990) isolou e identificou a microflora bacteriana de caldo fermentado em usinas paulistas com sérios problemas de contaminação bacteriana. Entre os isolados do caldo fermentado pelo menos 91% das culturas eram do gênero *Lactobacillus*. Destas havia um predomínio de 85% de

heterofermentativas do grupo III (classificação de Orla-Jansen, 1919 cit. em Oliva-Neto, 1990), 64% eram resistentes a 10% de etanol (v/v) e 67% eram indutoras da floculação de leveduras não floculentas. Houve um predomínio de *Lactobacillus fermentum* (62%), sendo encontrados numa mesma proporção *L. vaccinostercus* e *L. murinus* (9%) e, em menor quantia, *L. plantarum* (2 a 4%) e *Leuconostoc* (2%).

A bactéria *L. fermentum* recebe este nome por sua associação às leveduras em processos fermentativos de vegetais, mas também já foi encontrada em produtos lácteos, silagens, esgoto e em humanos (Kandler; Weiss, 1986).

### **Contaminação por leveduras nas destilarias produtoras de etanol**

Entre as leveduras contaminantes mais importantes estão, sem dúvida, outras linhagens da própria espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Estas rapidamente dominavam o processo industrial logo no início da safra. Esta é a razão pela qual a seleção de linhagens fermentativas no Brasil, para produção de etanol, foi feita a partir do isolamento das próprias usinas, com um bom perfil fermentativo e sem característica floculante, indesejável ao processo. Porém outros gêneros já foram encontrados e que são prejudiciais ao processo: *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Oidium*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Torula*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Dekkera*, *Brettanomyces* (Ducan; Colmer, 1964; Bevan; Bond, 1971, Oliveira, 1987; Lima et al., 1974; Tilbury et al., 1977, Silva, 1994).

As linhagens *Candida diddensii*, *C. tabiani*, *C. intermedia*, *C. santamari*, *Cryptococcus kuetzingii*, *Hansenula polymorpha*, *Kloeckera cortticis*, *Rhodotorula pallida*, *R. rubra*, *Saccharomyces uvarum*, *Torulopsis norvegica* e *Trichosporon cutaneum* foram encontradas na moenda de usina de cana-de-açúcar (Lima et al., 1974).

A levedura *Dekkera bruxellensis* (fase assexuada de *Brettanomyces bruxellensis*) foi identificada como a responsável por uma grave contaminação de destilaria de etanol no estado de São Paulo (Silva, 1994). Esta mesma levedura dominou o processo de outra destilaria de produção de etanol no estado da Paraíba, a qual só foi controlada quando houve redução de oxigênio no processo e elevou-se a concentração de etanol para 9% (Guerra,

1988). Esta levedura pode apresentar-se em elevado grau de contaminação em fermentações etanólicas pelo processo contínuo a baixas temperaturas, em função de maior taxa de multiplicação em relação à *S. cerevisiae* (Victor, 1996).

## **Importância da contaminação microbiana na estabilidade da fermentação alcoólica**

### **Efeito no rendimento e produtividade alcoólica**

O processo fermentativo de produção de etanol precisa manter-se estável para que seja viável economicamente. Grandes variações, seja na quantidade de células, na viabilidade celular, na homogeneização das células, nas perdas de fermento, ou na diminuição da velocidade de fermentação pelo catalisador do processo, a levedura, resultarão em perdas consideráveis em toda a cadeia produtiva, com aumento dos gastos com insumos, queda na eficiência alcoólica e produtividade do processo.

Os microrganismos contaminantes são os principais agentes que alteram a estabilidade do processo. Resumidamente, entre os problemas destacam-se:

- a) os contaminantes provocam uma competição pelo consumo de açúcar, desviando da produção de etanol para outros produtos, tais como: a biomassa, a produção de ácidos orgânicos (ácido acético e principalmente o ácido lático), e a produção de biopolímeros (levana, xantana e principalmente dextrana);
- b) a inibição ou morte da levedura por influência dos ácidos orgânicos, diminuindo a produção de etanol e aumentando o gasto com reposição celular;
- c) a floculação das células de *S. cerevisiae* por causa do contato físico com os contaminantes (leveduras e bactérias indutoras da floculação), os quais acarretam prejuízo no processo em função do aumento da contaminação microbiana e maior consumo de açúcar para produção de biomassa, via perda de fermento na centrífuga, fundo de dornas etc.;
- d) aumento de gasto com insumos tais como ácido sulfúrico, antibióticos, antiespumantes e dispersantes, encarecendo o custo de produção.

Se a deterioração da cana cortada e depositada no solo à espera do processamento pode levar a perdas de 4,75% a 11% (Egan, 1968, Tilbury, 1975); quando a contaminação ocorre na fermentação alcoólica tais perdas podem ser ainda mais significativas. Serra et al. (1979) relataram perdas de 15% no rendimento fermentativo. Amorim e Oliveira (1981) relataram uma correlação inversa entre acidez fixa do vinho e rendimento alcoólico sendo encontrados os piores valores (60%) para uma acidez expressa em ácido sulfúrico entre 5 a 6 g/l. Alterthum et al. (1984) relataram queda no rendimento fermentativo na faixa de 14-90% do teórico quando a concentração de bactérias atingiu níveis de  $10^8$  a  $10^9$  cel/ml. Cruz et al. (1985) verificaram quedas de 10-40% no rendimento, com altas concentrações de bactérias. Oliva-Neto e Yokoya (1994) avaliaram uma fermentação mista em laboratório com processo de batelada alimentada e reciclo de células de *S. cerevisiae* e *L. fermentum*. Estes pesquisadores constataram que *L. fermentum* dominaram o processo após o 8º ciclo chegando a níveis de  $10^9$  cel/ml, quando nenhum processo de controle foi usado. Houve uma diminuição acentuada do rendimento fermentativo chegando até a 46,7% em relação ao teórico, e houve uma queda de 53,5% da produtividade de etanol, com níveis de acidez superiores a 6,0 g/l expressos em ácido láctico. Em outro trabalho realizado com cultura mista com *L. fermentum* com reciclo de células, também foi verificado decréscimo no rendimento alcoólico (Thomas et al., 2001). Estes trabalhos vêm demonstrando a necessidade de um controle eficiente destes contaminantes na fermentação alcoólica para produção de etanol carburante.

### **Floculação celular**

A floculação celular consiste numa agregação de células individuais, quando em suspensão, formando flocos (peletes ou agregados) que, logo em seguida, sofrem sedimentação ou flotação. A autofloculação é denominada quando envolve as células de uma única linhagem que se agregam, e a cofloculação consiste no fenômeno de agregações ocorrendo entre diferentes linhagens (Stewart et al., 1975; Esser; Kues, 1983). A floculação difere do crescimento em grupos e formação de cadeias onde não há separação de células-filhas da célula-mãe durante o crescimento. Crescimento na forma de pseudomicélio ou pseudo-hifa pode agravar o tipo de floculação e isso é muito comum em destilarias de álcool.

A floculação do fermento usado nas indústrias produtoras de etanol é geralmente uma cofloculação entre *S. cerevisiae* com crescimento homogêneo e outra linhagem que pode ser outro *S. cerevisiae* ou, mais comumente, bactérias lácticas indutoras da floculação. Este fenômeno causa vários distúrbios, entre eles: a) o assentamento das leveduras nos fundo das dornas, o que dificulta a conversão do açúcar em etanol b) perda de células na etapa de centrifugação e o consequente gasto de substrato para a reposição celular, c) acidez do “vinho” (mosto fermentado e centrifugado), causada por bactérias produtoras de ácidos orgânicos, que é comprovadamente aumentada com o aumento da floculação, causando uma significativa queda no rendimento alcoólico e viabilidade de leveduras (Alterthum et al., 1984; Cruz et al., 1985; Oliva-Neto, 1990, 1994; Rose, 1980).

Diferentes fatores estão envolvidos na floculação celular da fermentação alcoólica, destacando-se: leveduras indutoras da floculação, biopolímeros tais como dextrana e, principalmente, bactérias indutoras que revestem a parede da levedura e são a mais comum causa deste fenômeno. Íons ferro e cálcio também provocam floculação sendo este último muito associado às leveduras e bactérias indutoras da floculação.

Diversos autores (Serra et al., 1979; Yokoya; Oliva-Neto, 1991; Oliva-Neto; Yokoya, 1994) demonstraram que a floculação do fermento nas destilarias produtoras de etanol pode estar intimamente associada ao tipo e grau de infecção no processo. Contaminantes da fermentação alcoólica com capacidade infectante são restritos a poucos gêneros, porque este ambiente é altamente seletivo, permitindo apenas o desenvolvimento de microrganismos resistentes ao etanol e a pH baixo. *Leuconostoc*, além de contaminar a fermentação alcoólica, provoca entupimento de tubulações, centrífugas e peneiras, por causa da floculação pela produção da goma dextrana, mas raramente chega a causar grandes infecções por causa de sua baixa resistência ao etanol.

### Floculação por leveduras

A floculação por leveduras depende diretamente das propriedades da parede celular, que, mesmo isolada, apresenta um comportamento semelhante às células intactas (Figura 14.1), determinadas por genes do locus FLO (Miki et al., 1982) e fatores como tratamento com manose, presença ou ausência de cálcio. Apesar disso, sabe-se que a floculação ocorre por meio de interações envolvendo a parede celular de células vizinhas (Eddy; Phil, 1955a; Stewart et al., 1975).

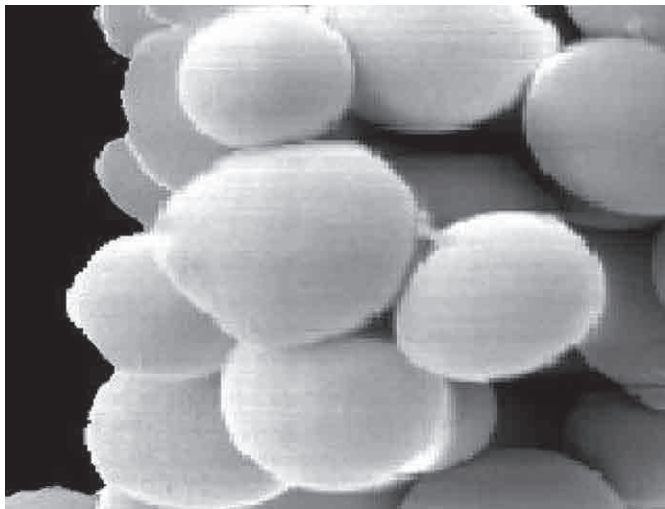


Figura 14.1 – Fotomicrografia para exemplificar a floculação entre leveduras.

Fonte: Fermentec

O mecanismo de agregação entre as células pode ser explicado de diversas formas, e, muitas vezes, os autores em busca da melhor explicação para este fenômeno apresentam hipóteses que se contradizem. Mas o envolvimento de proteínas da superfície celular é certo, pois o tratamento com proteases leva à perda irreversível da floculação (Calleja, 1974; Stratford; Brundish, 1990; Bowen et al., 1992). Na verdade, para explicar o processo de agregação entre as leveduras existem duas hipóteses básicas que devem ser levadas em consideração.

Na primeira hipótese, os autores assumem que as células de levedura se ligam através de pontes de hidrogênio formadas entre os grupos carboxílicos das proteínas da parede celular de um grupo de leveduras e os fosfatos das fosfomananas das células adjacentes. O cálcio atuaria induzindo a ligação e provocando a adesão celular (Masschelen et al., 1963; Lyons; Hough, 1971; Mill, 1964; Stewart et al., 1975).

Na segunda hipótese, diferentes autores assumem um modelo proposto, que recebeu o nome de “Modelo das Lectinas”, em que estas lectinas (glicoproteínas) da superfície celular podem mediar a interação célula-célula por ocorrer a combinação com carboidratos complementares de células adjacentes (Sharon; Lis, 1989).

A floculação de certas linhagens de leveduras pode ser inibida na presença de manose, maltose, glicose e sacarose. Sendo que isso sugere que os açúcares livres inibem a floculação por competição com os resíduos de açúcares das mananas da parede celular, por sítios ativos das lectinas-proteínas, causando o enfraquecimento das pontes entre as células, que se quebram por causa da agitação (Eddy; Phil, 1955b; Mill, 1964; Stratford, 1989; Taylor; Orton, 1978).

A ação de enzimas que destituem as paredes celulares de sua capacidade de formação de flocos também foi mostrada em diversos trabalhos desenvolvidos por Nishihara et al. (1977 e 1982) e Eddy et al. (1957). A importância da presença de estruturas proteicas na indução da floculação foi também evidenciada por Kamata; Murata (1984). Estes autores verificaram que a aglutinação das células foi diminuída com tratamento com enzimas proteolíticas (pepsina e pronase), enquanto as demais enzimas testadas (manase, lisozima, zimoliase, fosfatase ácida, lipase e ribonuclease) não tiveram o mesmo efeito.

Oliveira-Freguglia e Horii (1998) também observaram o papel de enzimas com ação desfloculante. Utilizaram enzimas do grupo peptidohidrolases (papaína, bromelina e ficina) e mostraram que as mesmas têm uma boa ação sobre o componente causal da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por *Lactobacillus fermentum*.

O cálcio é hábil na indução da floculação em pH 2,2 e 8,0, e a desfloculação pode ocorrer em pH extremamente baixo ou por lavagem com agentes como ácido etileno diamino tetracético (EDTA), ou mesmo com água deionizada. Este fenômeno pode ser reversível a partir da adição de  $\text{CaCl}_2$  (Mill, 1964b; Stratford, 1989).

A presença de íons cálcio nas suspensões se faz necessária para induzir a floculação numa concentração de 200 mM na forma de cloreto cálcio, e outros íons como sódio, potássio, estrôncio e bário têm efeito contrário, não induzindo a floculação (Kihn et al., 1988a; Mill, 1964b; Nishihara et al., 1982; Stratford; Brundish, 1990).

Em um estudo realizado por Castellon-Vogel e Menawat (1990) que tinham por objetivo principal desenvolver uma técnica rápida de análise fotométrica da floculação mediante soluções homogêneas de leveduras, foi observado que soluções de 10 mM e 1 M de sais monovalentes de sódio provocam a dispersão das células. Assim, pode-se dizer que os íons sódio são responsáveis pela desfloculação e se comportam como antagonistas aos íons cálcio.



Outros autores confirmaram que o pH do meio em que as células de levedura se encontram é muito importante para o desenvolvimento do fenômeno da floculação (favorecendo ou não), sendo que em pHs baixos o fenômeno não ocorre, mas aumentando esta faixa acontece a refloculação (Calleja, 1974). Os estudos de Porter e Macaulay (1965) com leveduras floculantes cultivadas em meio semissintético em diferentes pHs revelaram que as células em níveis de pHs muito baixos não flocularam, enquanto em pHs mais elevados estas células tornaram-se hábeis na floculação, confirmando a afirmação acima.

O valor de pH está diretamente ligado à indução ou não da floculação de leveduras. Segundo Stratford (1996), que testou diferentes linhagens de leveduras e a capacidade de formação de flocos em relação ao pH, a conclusão é de que a floculação se desenvolve bem em faixas de 4,5 a 6,3, enquanto em pH abaixo desta faixa a floculação praticamente não aparece. Isso justifica o tratamento com ácido sulfúrico, atualmente desenvolvido nas indústrias alcooleiras, para determinar a desfloculação das leveduras.

A agitação também é importante para que ocorra o mecanismo de floculação na indústria. A agitação “natural” que pode ser causada pela passagem de bolhas de gás durante a fermentação poderia determinar um aumento no grau de floculação, alcançando o equilíbrio dinâmico entre as células floculantes e células livres (Stratford; Keenan, 1988).

### Floculação por bactérias

No caso da participação de bactérias para a formação dos flocos com leveduras, os fatores que mais se destacam são: gomas excretadas por bactérias, que provocam uma adesão entre as células de levedura (Serra et al., 1976), e interação direta de parede-parede, bactéria - levedura, que também levaria à formação de flocos. Yokoya e Oliva-Neto (1991) comprovaram a capacidade de floculação do fermento por certas linhagens de *Lactobacillus fermentum*. O tratamento térmico ou por proteases causou a destruição da propriedade floculadora da bactéria. A faixa de pH necessária para ocorrer a floculação foi por eles determinada como uma faixa próxima de pH 3,0 a 3,5, pois em pH superior a 12 e inferior a 2,5, a desfloculação já podia ser observada (Gráfico 14.1). Na indústria, a presença de íons cálcio também se faz necessária para que ocorra a floculação. Este íon já existe no processo advindo das células de levedura e também do mosto de fermentação.

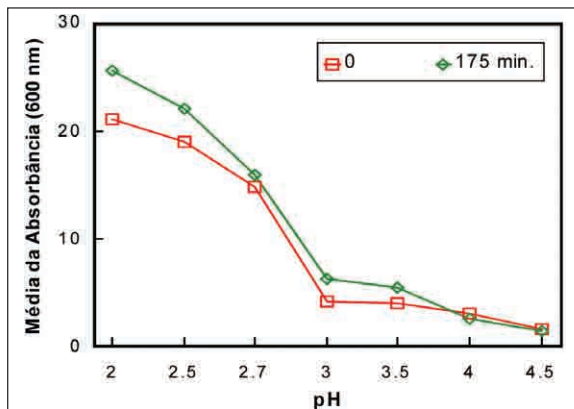


Gráfico 14.1 – Efeito do pH sobre a capacidade de *Lactobacillus fermentum* floccular *Saccharomyces cerevisiae* avaliada pela queda da absorbância no início e após 175 minutos de contato.

Fonte: Ludwig, 2005

### Mecanismo de floculação entre bactérias e leveduras

O mecanismo de floculação entre as células de bactérias contaminantes e as leveduras está associado ao contato físico entre a parede celular dos dois microrganismos (Figura 14.2), e existe uma relação ótima entre a quantidade de células de bactéria e levedura para causar a floculação (Figura 14.3). Segundo Yokoya e Oliva-Neto (1991), por contagem microscópica essa relação é de 4,8 (bactéria/levedura), o que explica a aparição repentina de floculação em indústrias de produção de etanol, quando ocorre um aumento da contaminação bacteriana principalmente por *Lactobacillus fermentum*.

Segundo Bromberg e Yokoya (1995), resíduos de aminoácidos da superfície de *Lactobacillus fermentum* e resíduos de carboidratos das leveduras são responsáveis pelo desenvolvimento do fenômeno da floculação. As reações com vários reagentes de modificação proteica indicaram que o grupo indol do triptofano e o grupo hidroxil fenólico da tirosina devem estar presentes na superfície celular bacteriana para a floculação ocorrer. Os resíduos de carboidratos na superfície celular de leveduras, que é responsável pela ligação, é provavelmente manana que tem sido demonstrado por experimentos de inibição por açúcares (Santos; Yokoya, 1993).

Os estudos sobre formação de flocos entre tipos celulares diferentes, como a floculação em usinas que pode ocorrer entre a levedura do processo e contaminantes como bactérias do gênero *Lactobacillus* já provocaram muitos questionamentos, mas já é certo que as estruturas químicas compo-

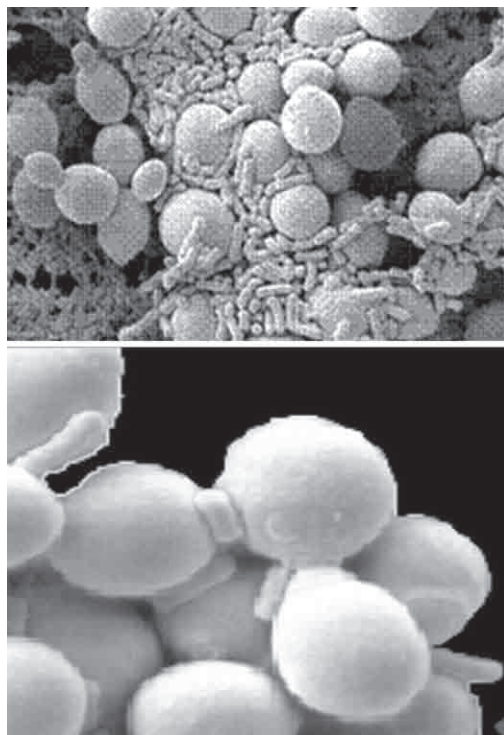


Figura 14.2 – Fotomicrografia para exemplificar a flocculação entre leveduras e bactérias.

Fonte: Fermentec (Piracicaba – SP)

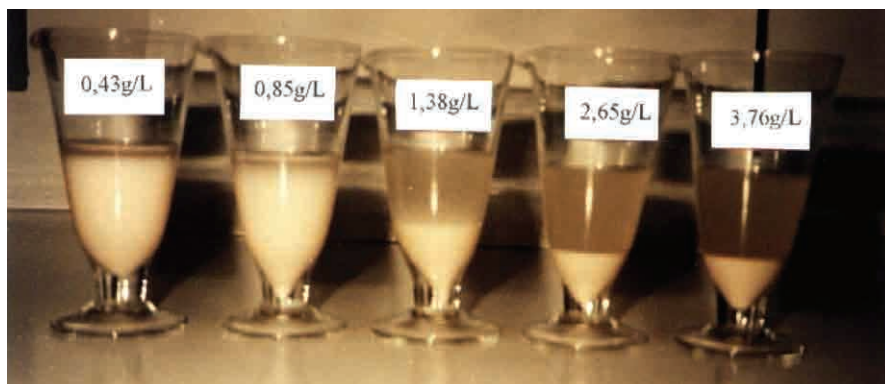


Figura 14.3. Efeito da concentração de bactérias (*L. fermentum* CCT 1396) na indução da flocculação de *Saccharomyces cerevisiae* 20 minutos após adição da bactéria.

Fonte: Ludwig et al., 2001

nentes das paredes celulares estão envolvidas neste mecanismo de adesão (Ngondi-Ekome et al., 2003).

O mecanismo de adesão de uma linhagem de *Lactobacillus fermentum* (737) ao epitélio estomacal de camundongos foi estudado e os autores concluíram que o fator promotor da adesão das células se encontrava no sobrenadante do meio de cultura, pois as células bacterianas lavadas tiveram sua capacidade adesiva reduzida. Os fatores promotores da adesão são específicos do hospedeiro, estando intimamente ligados às superfícies das células bacterianas e epitelial, não tendo a capacidade de promover a adesão de duas outras linhagens de *Lactobacillus fermentum*. A adesina mostrou-se sensível ao tratamento térmico e enzimático com “pronase E”, indicando sua natureza proteica (Conway; Kjelleberg, 1989).

### Controle de floculação

O tratamento convencional com ácido sulfúrico sob agitação (Bovi; Marques, 1983) apesar de eficaz na desfloculação, não é duradouro para combater a floculação do fermento causada por contaminantes da fermentação, permitindo a volta do fenômeno em função da alteração de pH, quando o inóculo tratado é retornado à dorna de fermentação. A faixa de pH utilizada no tratamento do fermento (2,0 - 2,5) pode afetá-lo, tendo como consequência uma diminuição da viabilidade celular. O tempo de permanência do fermento durante o tratamento é 0,5 a 2 horas, e quanto maior for esse tempo e menor o pH, maior será o impacto prejudicial ao metabolismo da levedura.

### Efeito do tratamento com ácido sulfúrico

A lavagem do fermento com ácido sulfúrico, além de contribuir para o controle dos contaminantes da fermentação alcoólica, é o principal método de controle da floculação do fermento (Oliva-Neto, 1995).

O tratamento com ácido sulfúrico é feito diminuindo o pH do fermento, diluído em água, a uma faixa de 2,0 a 3,0. Ao fermento mantido na cuba, são adicionados ácido sulfúrico e água e mantidos em constante agitação. O tempo de tratamento é variável (até 3 horas), quanto maior for este tempo, menor a viabilidade celular. As células de levedura mais jovens e as mais velhas são menos resistentes ao tratamento (Bovi; Marques, 1983).

O uso excessivo do ácido sulfúrico para o controle do contaminante é uma prática danosa às células de levedura num processo de fermentação alcoólica (Rodine, 1985; Dorta et al., 2006). O tratamento ácido excessivo

pode ter efeito abrasivo sobre a parede da levedura, que é essencial para sua viabilidade e produção de etanol; assim, segundo Paterson et al. (1988), a intensidade do tratamento deve variar de acordo com o índice de contaminação do meio. Entretanto Gomes (1988) não observou nenhuma ação drástica sobre a viabilidade celular em experimentos de laboratório utilizando *S. cerevisiae* quando o leite da levedura foi tratado em três níveis de pH (2,0; 2,5 e 3,0) ajustados com ácido sulfúrico, obtendo maiores rendimentos em relação aos controles. Foi observada a redução de 44,3% da microbiota contaminante, em função do vigor e tempo de tratamento (Gallo; Canhos, 1991).

Alves da Silva (1993) mostrou por seus experimentos que o uso do ácido sulfúrico como agente de desinfecção do leite de leveduras constitui-se numa das práticas mais eficientes e econômicas para a fermentação alcoólica. Entretanto, seu uso não deve ser indiscriminado, mas baseado num rigoroso acompanhamento dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do processo fermentativo.

Embora muitos pesquisadores defendam o uso do ácido sulfúrico como descontaminante do processo de fermentação alcoólica, para outros sua prática não é eficiente, elevando o custo com este reagente, além do perigo do transporte, manipulação e danos ao meio ambiente quando o vinho delevurado (com o ácido) é despejado ao solo (Otenio, 1998). Para Nunes et al. (1991), o uso do ácido sulfúrico é inadequado, porque o tratamento ácido não funciona como descontaminante. Estes pesquisadores defendem o ajuste dos processos de centrifugação, alimentação e nutrição, como a solução para um bom processo fermentativo. A adição de ácido sulfúrico e de bactericidas, seja qual for a quantidade, é inadequada e inoportuna passando, então, a ter a função de destruidor de leveduras e enzimas. Esta adição causa muitas reações químicas resultando no desequilíbrio do importante sistema de enzima-substrato no meio de fermentação. Ainda, o tratamento ácido da levedura quando floculada induz a dispersão do fermento e das bactérias, mas não sua total eliminação (Guerra; Angelis, 1998). Apesar da eficácia do tratamento na desfloculação do fermento, esta não é duradoura, sendo revertida em função do pH quando o inóculo tratado é retornado à dorna fermentativa (Bovi; Marques, 1983). Além disso, a utilização do pH baixo (2,0-2,5) pode afetar o metabolismo da levedura (Ludwig et al., 2001).

Otênio (1998) mostrou que o tratamento ácido não foi eficiente para o aumento do teor alcoólico da dorna, volume do fermento da dorna, acidez fixa, tempo de fermentação, viabilidade e brotamento da levedura na Usina de Bandeirantes/ PR.

Um tratamento alternativo, com o uso de enzimas foi proposto por Ludwig (1998). Foram testadas duas enzimas: uma proteolítica (Novozyme 642) e uma carbohidrase (SP 299), ambas da Novo Nordisk, que se mostraram eficazes na desfloculação do fermento e, ainda mais, não alteraram a viabilidade das células e seu efeito foi irreversível. Mas como enzimas não se apresentam viáveis economicamente por causa de dosagens relativamente altas, a aplicação industrial ainda não é possível. Assim, tecnologias que possam ser estudadas visando à diminuição do custo de aplicação de enzimas podem viabilizá-las para o uso industrial. Entre estas técnicas estão sendo estudados processos de imobilização de proteases em quitina (Rosa, 2008; Oliva-Neto et al. 2009), quitosana (Carignatto et al. 2010) e agarose-glioxil e sabugo de milho – glioxil (Silva et al., 2010) visando à desfloculação celular de *S. cerevisiae* de destilarias de etanol.

### **Relação antagônica entre *S. cerevisiae* e bactérias contaminantes**

#### **Fatores que afetam o metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***

Para entender as relações ecológicas entre o agente catalisador do processo de produção de etanol carburante e os contaminantes envolvidos, é necessário primeiro conhecer os fatores que afetam o metabolismo de *S. cerevisiae* tanto de forma isolada, como principalmente de forma sinérgica, na qual a inibição é potencializada. Entre os fatores importantes destacam-se: a) concentração de sacarose que influi na pressão osmótica do meio e no teor de etanol via fermentação, que, em condições elevadas, pode ser inibidor; b) pH e acidez, que afetam respectivamente a bomba de prótons e outras funções celulares, tais como o consumo de nutrientes; c) sulfito, que pode ter efeito inibidor no metabolismo de consumo de açúcar.

#### **Inibição pelo substrato**

A sacarose, principal substrato utilizado na produção etanólica no Brasil, é hidrolisada primeiramente em glicose e frutose pela invertase periplas-

mática ( $\beta$ -D-*fructofuranoside fructohydrolase*, E.C.3.2.1.26) (Zech; Görish, 1995) produzida pela própria levedura. Por meio do processo de difusão facilitada da membrana do microrganismo por permeases (Cartwright et al., 1989), tais açúcares fosforilados podem fazer parte da via Glicolítica.

Segundo Chapman e Bartley (1968), as enzimas respiratórias das leveduras são inibidas a partir de 2 g/l de glicose no meio, o que torna a fermentação a principal via de degradação do açúcar, mesmo em condições aeróbias. Tal inibição é denominada Efeito Crabtree (Weusthuis et al., 1994).

A fermentação etanólica com açúcares em concentrações excedentes a 27% (p:v) é lenta e poucos sacarídeos são convertidos em açúcares (Bafnrcová et al., 1999). Altas concentrações de açúcares no mosto fermentativo são responsáveis pela parada ou diminuição da fermentação por causa do aumento da pressão osmótica e da alta toxicidade do etanol para as células de leveduras (Bisson; Butzke, 2000; Malacrinò et al., 2005). Segundo Oliveira-Neto (1990), a condução pelo processo de batelada alimentada permite evitar o efeito inibidor do açúcar na fase inicial da fermentação.

### Efeito protetor da trealose

A trealose é um dissacarídeo constituído por duas unidades de glicose com ligação no carbono anomérico, dessa maneira, não é redutora (Leloir; Cabib, 1953, apud Panek, 1991). Segundo a literatura, a trealose é um carboidrato de reserva e de proteção das leveduras em situação de estresse como temperatura elevada, toxicidade do etanol, desidratação celular e aumento da pressão osmótica; sendo esta acumulada em presença de oxigênio, em baixas concentrações de açúcares, como quando há exaustão da glicose no meio durante a fase de diauxia (Panek, 1975; Crowe et al., 1984; Thevelein, 1984; Hottinger et al., 1987; Panek et al., 1990; Alcarde; Basso, 1997).

De acordo com Mackenzie et al. (1988), a resistência de leveduras à pressão osmótica foi acompanhada por acúmulo de trealose. Sharma (1997) mostrou que a exposição de *Saccharomyces cerevisiae* a concentrações estressantes de NaCl estimulou o acúmulo de trealose na levedura e aumentou sua resistência ao etanol.

Leveduras provenientes de três destilarias de produção artesanal de cachaça revelaram capacidade de produzir invertase e acumular trealose na presença de glicose, além disso, foi observada uma forte relação entre o

acúmulo de trealose intracelular e a viabilidade celular (Pataro, 2002). A análise do teor da trealose produzida pela levedura mostra ser um eficiente parâmetro para verificação do nível de estresse em que esta é submetida.

### Efeito antagonico do ácido láctico

Segundo Oliva-Neto (1995), a ação inibitória de ácidos orgânicos sobre as leveduras depende da concentração do ácido e da levedura usada no processo fermentativo, do sinergismo com outros produtos e a pressão osmótica do meio. Existe uma ampla classe de ácidos que causa danos à fermentação etanólica, como ácido acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico (Samsom et al., 1955), fórmico, láctico (Maiorella et al., 1983), octanoico e decanoico (Lafon-Lafourcade et al., 1984; Viegas et al., 1989; Viegas; Sá-Correia, 1997). Entretanto, o ácido láctico destaca-se frente aos outros ácidos durante a contaminação pelas bactérias lácticas que são muito frequentes nos processos fermentativos industriais (Oliva-Neto, 1990; Halm, 1993; Hynes et al., 1997; Nobre, 2005).

Segundo Maiorella et al. (1983), os ácidos acético, fórmico e láctico têm o efeito inibitório por interferência química das funções de manutenção das células. O ácido láctico possui uma hidroxila extra, caracterizando-se assim por uma menor solubilidade aos lipídeos em relação aos outros dois citados, e sua propriedade inibitória ocorre em concentrações mais elevadas, na faixa de 10-40 g/l. Daeschel et al. (1988), utilizando espécies de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces rosei* junto a *Lactobacillus plantarum* como contaminante, durante uma fermentação com suco de repolho, estabeleceram concentrações inibitórias de ácido láctico para o crescimento celular a partir de 2g/l. Oliva-Neto e Yokoya (1994) constataram que após o 15º ciclo de um processo fermentativo, a eficiência alcoólica sofreu uma marcante inibição quando o ácido láctico ultrapassou 6 g/l e o número de bactérias contaminantes tornou-se maior que  $1,2 \times 10^9$  / ml.

Cassio et al. (1987) demonstraram o processo ativo simultâneo do próton-lactato para o acúmulo de lactato no interior da célula de *S. cerevisiae*, na proporção 1:1. Segundo os mesmos autores, a taxa de acúmulo do referido ânion no interior da célula depende da oscilação do pH fora e dentro da célula. Permeases também foram citadas como envolvidas no processo de transporte ativo do lactato (Cassio et al., 1987; Narendranath et al., 2001).



Contrariamente, a forma não dissociada do ácido láctico atravessa a membrana plasmática por difusão passiva. No interior da célula, a forma não dissociada do ácido láctico se ioniza, pois o pH intracelular é em torno de 6,0 a 7,0 e o pKa do ácido láctico é igual a 3,86 causando, assim, a acidificação do citosol. Com o acúmulo de H<sup>+</sup> intracelular, a H<sup>+</sup>-ATPase intensifica sua atividade para expulsar estes prótons (Holyoak et al., 1996). O aumento da atividade de H<sup>+</sup>-ATPase, em função da acidificação interna, resultará em uma significativa diminuição da energia necessária para o crescimento da levedura e outras funções metabólicas essenciais (Brul; Coote, 1999) e com o tempo não será possível a manutenção do pH intracelular levando a diminuição do crescimento e, finalmente, a morte celular (Halm et al., 2004).

De acordo com Essia-Ngang et al. (1989), a pressão osmótica do meio e a quantidade do inóculo exerceram influência no grau de toxicidade do ácido láctico, durante o cultivo em melão de beterraba para a produção de álcool. Nos testes em que havia maior pressão osmótica, 2,5 g/l foram suficientes para causar uma inibição na taxa específica de produção de etanol. Entretanto, em mostos com baixa pressão osmótica, com até 10 g/l de ácido láctico houve aumento da taxa específica de produção do álcool. O aumento do inóculo de levedura amenizou o efeito tóxico do referido ácido.

### Efeito tóxico do etanol

O etanol pode tornar-se tóxico para a célula de levedura (Ghoose; Tyagi, 1979; Beaven, 1982; Leão; van Uden, 1982). A tolerância a altas concentrações de etanol é dependente da linhagem, e, para a maioria das linhagens tolerantes, a concentração máxima de etanol que não inibe o crescimento é de 10% (p:v) (Jones et al., 1981).

As enzimas hexoquinase e a álcool desidrogenase são mais sensíveis a grandes concentrações de etanol (Casey; Ingledew, 1976; Sharma; Tauro, 1987). Millar et al. (1982) consideraram a invertase, frutose-1,6-bifosfato aldolase e piruvato descarboxilase as mais sensíveis enzimas. Segundo Zech; Görisch (1995), a invertase de *Saccharomyces cerevisiae* sofre inativação de até 100% quando submetida a altas concentrações de álcool (acima de 8% v:v) e concentrações de NaCl ocorrida no meio industrial com o melão, sendo esta condição reversível quando tais inibidores têm sua concentração diminuída.

O etanol não se concentra no interior da célula de *Saccharomyces cerevisiae* (Guijarro; Lagunas, 1984, apud Cartwright, 1989). Segundo a literatura, o lugar de ação do etanol é na parte fosfolipídica das membranas, onde se liga no interior hidrofóbico causando enrijecimento e, conseqüentemente, acarretando distúrbios dos sistemas de transportes (Loureiro-Dias; Peinado, 1982; Leão; van Uden, 1982; Ingram, 1985). Além disso, diminui a capacidade de seletividade da membrana plasmática, permitindo a saída de constituintes celulares e a entrada passiva de prótons, reduzindo, assim, o potencial de membrana e, por fim, interferindo em todos os sistemas que requeiram força protomotiva. Tal descontrole celular acaba resultando em deficiências nutricionais, o que intensifica a inibição alcoólica (Casey et al., 1984; Dombek; Ingram, 1986).

O etanol inibiu de forma não competitiva o transporte de maltose e glicose através da membrana plasmática (Leão; van Uden, 1982; Loureiro-Dias; Peinado, 1982) de *Saccharomyces cerevisiae*.

Oxigênio molecular (Andreason; Stier, 1954, Buttke et al., 1980, Buttke; Pyle, 1982) e lipídeos têm sido acrescentados em processos fermentativos para a manutenção da atividade de altas taxas de rendimento alcoólico, uma vez que a produção de ácidos graxos insaturados fica comprometida em anaerobiose (Thomas et al., 1978, Beavan et al., 1982, Casey et al., 1984). Foi observada uma melhora do metabolismo da levedura durante a fermentação quando se adicionou colesterol de membranas de mamíferos (Chin et al., 1984).

### Efeito inibitório do sulfito

O sulfito de sódio no processo industrial é incorporado no melaço de cana na faixa de 200 a 700 mg/l (Oliva-Neto; Yokoya, 2001), formando algumas vezes mostos com até 300 mg  $\text{SO}_2/\text{L}$ , especialmente quando envolve a presença de caldo sulfitado da fábrica de açúcar.

Segundo a literatura, o dióxido de enxofre é uma substância muito reativa e sua ação inibitória está diretamente relacionada com o pH, já que se caracteriza por duas constantes de dissociação. Entre os valores de pH mais baixos, coexistem as formas bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) e dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), com  $\text{pK}_1 = 1,77$ , enquanto entre valores de pH 5,0 e 9,0, há uma composição mista de bissulfito e sulfito ( $\text{SO}_3^{-2}$ ), sendo o  $\text{pK}_2 = 6,9$ . Uma vez que o

pH da fermentação é baixo (ambiente ácido), parte do sulfito encontra-se na forma mais tóxica ( $\text{SO}_2$ ) na ausência de oxigênio. O  $\text{SO}_2$  é transportado para o interior da célula, entretanto, converte-se nas outras duas formas, por causa de o ambiente ser caracterizado pelo valor de pH próximo a 6 (Carr et al., 1976; Anacleto; van Uden; 1982, Cartwright et al., 1989).

O bissulfito pode formar ácidos hidroxissulfônicos pela reação com grupos carbonílicos de aldeídos, ácidos orgânicos e outros. Compostos como acetaldeído-bissulfito são bactericidas. O bissulfito ao reagir com o acetaldeído bloqueia a regeneração do NAD requerido pela glicólise em leveduras (Harada et al. cit. Warth, 1985).

Segundo Alves (1994), Basso (1991) constatou que, na adição de 100 mg  $\text{SO}_2/\text{l}$  na forma de  $\text{NaHSO}_3$ , 40% de tal substância reage com componentes do mosto e apenas 45% do acetaldeído teórico pode ser detectado. Em tal experimento, ocorreram uma diminuição da eficiência fermentativa e do crescimento celular. Brechot et al. (1969) verificaram a inibição de 30% a 40% na fermentação e de 40% a 80% na respiração por adição de sulfito no mosto. Maiores teores de metabissulfito, na produção de etanol combustível a partir da beterraba, foram responsáveis por diminuição na produtividade alcoólica e queda na viabilidade celular (Gibbons; Westby, 1987).

Gutierrez (1988), entretanto, verificou que na presença de 219 mg de  $\text{SO}_2/\text{l}$  de meio de melaço não alterou a produção de etanol a pH 4,0, havendo diminuição de álcoois superiores e elevação no teor de acetaldeído. Alves (1994) chegou à conclusão que a presença de sulfito no mosto fermentativo pode ser benéfica se este atuar como bactericida, pois, segundo tal autora, a contaminação pelo microrganismo causa maiores danos ao rendimento alcoólico. Oliva-Neto e Yokoya (2001) concluíram que o CMI (Concentração Mínima Inibitória) para o sulfito de sódio, em pH 4,5, foi na faixa de 10-40 mg/l para bactérias lácticas, já para a levedura o CMI foi de 5000 mg/l, nas mesmas condições. Em pH 6,5 o valor do CMI para a levedura foi o mesmo; entretanto, para as bactérias lácticas, este ficou na faixa de 312-625 mg/l, mostrando ser mais eficiente para estas na faixa de pH 4,5.

Anacleto e Van Uden (1982) estudaram a cinética de morte celular em função da elevação da concentração do sulfito e da temperatura. Tais pesquisadores propuseram, por meio de um modelo cinético da morte celular, que existem dois sítios na superfície da membrana que estão envolvidos com o grau de toxicidade do sulfito. O primeiro SDD (provavelmente uma

proteína) teria alta afinidade pelo  $\text{SO}_2$ , funcionando como um catalisador e diminuindo a energia de ativação para a termodesnaturação ou ativação da ATPase. O segundo sítio de ligação seria o EM que, em presença do dióxido de enxofre, aumentaria a entropia do processo, induzido pela ocupação do primeiro sítio. A morte celular ocorre quando há a saturação dos dois sítios.

Os níveis de ribonucleosídeos fosfatos de leveduras sofrem um drástico decréscimo na presença de 2mM de  $\text{SO}_2$  a pH 3,6. A atividade de ATPase é aumentada com 1mM de  $\text{SO}_2$  (Maier et al., 1986).

#### pH e a atividade de $\text{H}^+$ -ATPase

Um fator muito importante para a produção etanólica é o potencial hidrogeniônico do meio, tanto para o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de produtos, quanto para o controle da contaminação bacteriana (Alves, 1994). As bactérias são menos resistentes ao pH baixo e têm menor velocidade de crescimento que as leveduras em tal situação. Enquanto para as bactérias lácticas o pH ideal é na faixa de 6,0, a levedura *S. cerevisiae* apresenta um bom rendimento na produção alcohólica em pH acima de 3,8 (Kandler; Weiss, 1986).

Segundo Souza et al. (2001), a enzima  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana plasmática de *S. cerevisiae* controla um importante processo fisiológico. Por meio da Bomba de prótons, tal enzima regula o pH intracelular (pHi) e promove a força motora para a elevação de nutriente. Uma marcante característica desta enzima é o fato de esta ser ativada em presença de glicose que causa a acidificação interna aumentando o nível de sua atividade em células de leveduras (Becher dos Passos et al., 1992; Souza et al., 2001). A levedura para evitar que seu pHi se torne muito ácido, libera  $\text{H}^+$  para o meio externo por meio da ativação de  $\text{H}^+$ -ATPase, além de absorver  $\text{K}^+$  e aminoácidos básicos, excretar ácidos orgânicos e liberar gás carbônico (Coote; Kirsop, 1976).

A  $\text{H}^+$ -ATPase plasmática sofre alterações conformacionais em função de  $\text{H}^+$  (Blanpain et al., 1992), assim em pH igual a 4,0 triplica sua atividade, dobrando a afinidade por ATP, sem, porém, causar mudanças no pH ótimo (6,0) (Eraso; Gancedo, 1987). Quando o pH diminui de 6 para 3, existe um aumento da sensibilidade da levedura ao etanol (Gao; Fleet, 1988), dissipando a força próton motiva da membrana.

Quando a célula sofre um dano metabólico a  $\text{H}^+$ -ATPase presumivelmente a ajuda ativando a força protonmotiva por meio da membrana plas-

mática com o gasto de ATP. A acidificação intracelular ocorre na presença de estressores que afetam a organização da membrana plasmática (Viegas; Sá-Correia, 1991; Alexandre et al., 1996; Carmelo et al., 1997; Viegas et al., 1998; Fernandes et al., 1998). Etanol (Rosa; Sá-Correia, 1991), ácidos octanoico, decanoico (Viegas; Sá-Correia, 1997), succínico, acético (Carmelo et al., 1997), cinâmico (Chambel et al., 1999), pH ácido (Eraso; Gancedo, 1987), escassez de fonte de nitrogênio (Benito et al., 1992) e temperaturas supraótimas (Viegas et al., 1995) estimulam *in vivo* a atividade de  $H^+$ -ATPase da levedura.

Segundo alguns pesquisadores, a ativação desta enzima não pode ser atribuída a sua síntese, e sim a alterações pós-tradução desta proteína, uma vez que o número total de enzima diminui em condições de estresse e sua atividade é aumentada. Esta ativação de ATPase pode ser causada, ao menos em parte, pela alteração na porção lipídica da membrana plasmática que modifica a disposição de suas enzimas contribuindo para o maior contato com seu substrato (Viegas et al., 1995; Carmelo et al., 1997). Chang e Slaman (1991) mostraram uma correlação entre a fosforilação da glicose e a ativação de  $H^+$ -ATPase.

Na Figura 14.4, está esquematizado o mecanismo de acidificação intracelular de *S. cerevisiae* quando a bomba de prótons já não consegue mais responder ao excesso de  $H^+$  do meio, resultando na morte celular.

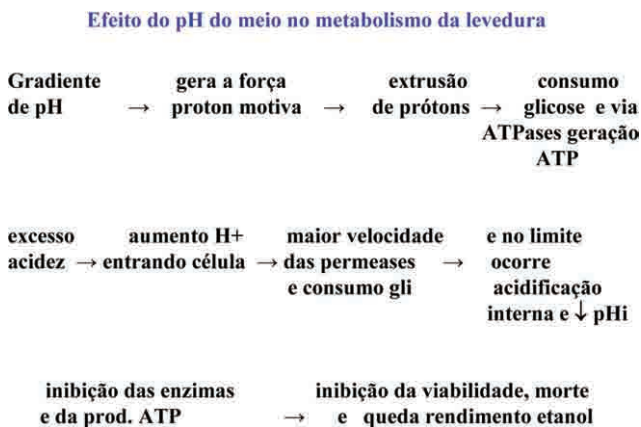


Figura 14.4 – Fluxograma explicativo da inibição da força próton motiva e pelo excesso de acidificação do meio.

O estudo (Dorta et al., 2006) avaliando o sinergismo entre ácido láctico, sulfito, pH e etanol como inibidores da fermentação alcoólica de mosto de caldo de cana foi realizado com dois *S. cerevisiae* de uso industrial (Pe-2 e M-26). Entre as linhagens foram submetidas adição de 200 mg/l de  $\text{NaHSO}_3$ , 6 g/l de ácido láctico, 7,5% até 9,5% de etanol e pH 3,6 e 4,5. Entre estes fatores, o pH baixo (3,6) seguido do etanol a 9,5% foram os maiores fatores de estresse para as leveduras durante a fermentação. Na Figura 14.5, são demonstradas as diferenças na morfologia das leveduras submetidas aos fatores de estresse em *S. cerevisiae* Pe-2, em que o pH 4,5 protegeu a levedura demonstrada pelo maior número, tamanho e forma ovalada (A) em relação às leveduras inibidas, mais estreitas e em menor número.

O trabalho apresenta também, no meio com pH 4,5 (meio 5,0) em relação ao meio 1 (com todos os inibidores), os seguintes resultados: maior viabilidade celular (Gráfico 14.2), índice de brotamento (Gráfico 14.3), rendimento e produtividade etanólica, consumo de açúcar, e maior teor de trealose, bem como menor teor de proteína solúvel (Gráfico 14.4), este último indicando a autólise das células no meio mais ácido. Os autores concluem que é muito importante que o pH do meio não seja excessivamente acidificado, para preservar a bomba de prótons da levedura, e assim proteger o metabolismo dos vários fatores de estresse aos quais a levedura é submetida em condições industriais (Dorta et al., 2006).

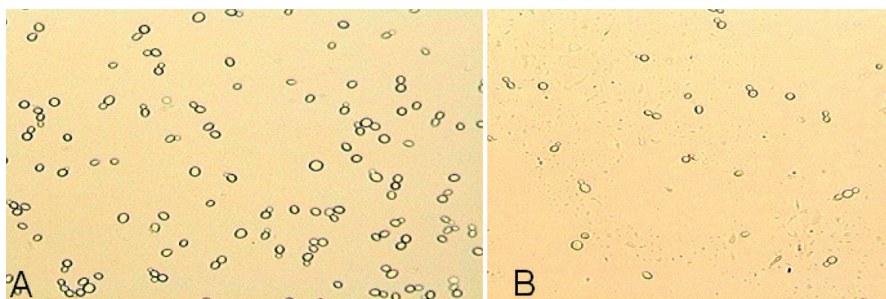


Figura 14.5 – Fotomicroscopia (1000 x) do efeito morfológico de *S. cerevisiae* Pe-2 submetida a uma fermentação num meio contendo diversos fatores inibidores (ácido láctico, sulfito, etanol), em pH 4,5 – Meio 5 (A) e pH 3,6 – Meio 1(B).

Fonte: Dorta, 2006

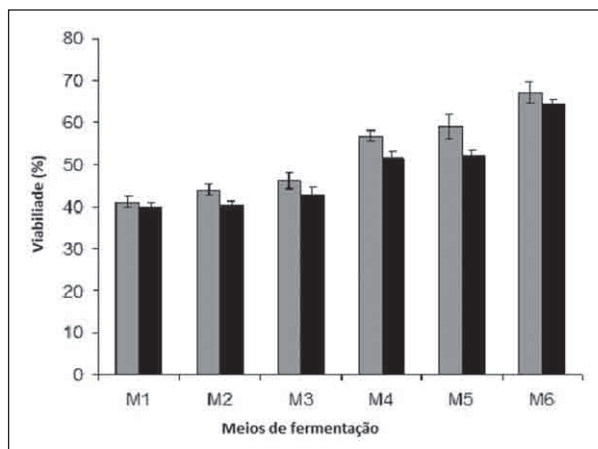


Gráfico 14.2 – Viabilidade das células de leveduras após fermentação em diferentes condições de estresse fisiológico. Meio 1 (todos inibidores), Meio 2 (todos menos sulfito), Meio 3 (todos menos acidez láctica), Meio 4 (todos menos etanol), Meio 5 (todos menos pH baixo), Meio 6 (controle sem inibidores). PE- 2 (■) e M-26 (■).

Fonte: Dorta et al., 2006

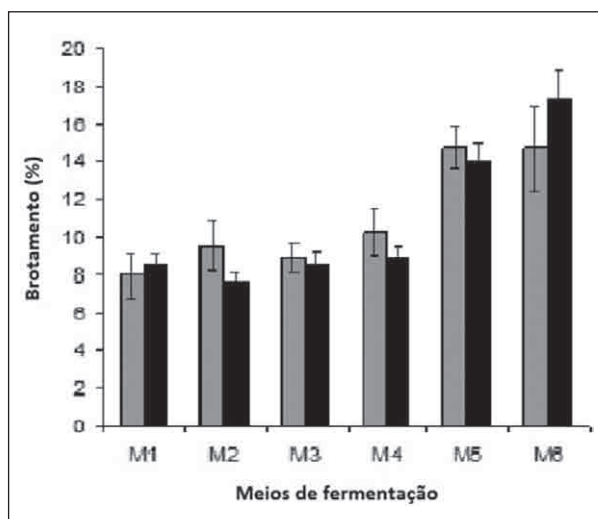


Gráfico 14.3 – Brotamento das células de leveduras após fermentação em diferentes condições de estresse fisiológico. Meio 1 (todos inibidores), Meio 2 (todos menos sulfito), Meio 3 (todos menos acidez láctica), Meio 4 (todos menos etanol), Meio 5 (todos menos pH baixo), Meio 6 (controle sem inibidores). Linhagens PE- 2 (■) e M-26 (■).

Fonte: Dorta et al., 2006

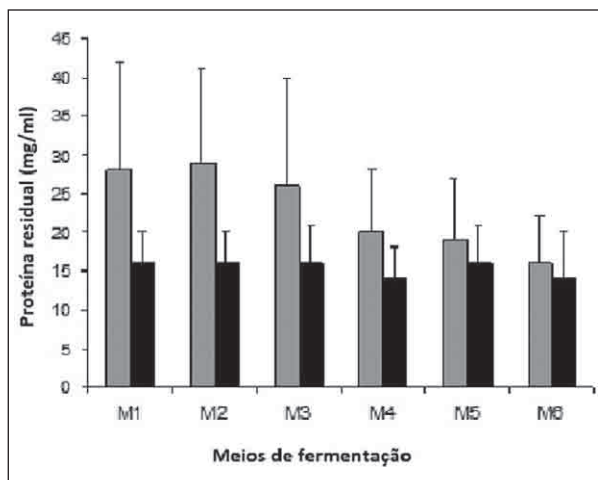


Gráfico 14.4 – Proteína solúvel no meio após fermentação de *S. cerevisiae* em diferentes condições de estresse fisiológico. Meio 1 (todos inibidores), Meio 2 (todos menos sulfito), Meio 3 (todos menos acidez láctica), Meio 4 (todos menos etanol), Meio 5 (todos menos pH baixo), Meio 6 (controle sem inibidores). Linhagens PE- 2 (■) e M-26 (■). Fonte: Dorta et al., 2006

### Relação ecológica entre *S. cerevisiae* e *Lactobacillus* sp durante a fermentação para produção de etanol carburante

Os *Lactobacillus* têm ampla distribuição, são espécies principalmente acidófilas e tolerantes ao etanol, vulgarmente denominadas de bactérias lácticas, são sacarolíticas (Tilbury, 1975; Priest, 1981; apud Alves, 1994), sendo exigentes em termos nutricionais, principalmente quanto aos aminoácidos (Oliva-Neto; Yokoya, 1997). Segundo Hynes et al. (1997), a contaminação por bactérias lácticas é o maior problema da fermentação industrial de álcool. O crescimento das referidas bactérias reduz o rendimento alcoólico por causa do consumo de glicose que seria destinada à síntese etanólica, além da competição dos nutrientes do meio e do efeito tóxico do ácido láctico (Yokoya, 1991, Hynes et al., 1997).

Walksman, segundo Alves (1994), em 1945 concluiu que as relações antagônicas entre as leveduras e as bactérias lácticas são marcadas por um amplo número de substâncias tóxicas, abrangendo desde compostos simples como ácidos orgânicos, álcoois, até polipeptídeos, proteínas e derivados do metabolismo secundário.



Alguns nutrientes têm sido propostos como estimulantes do crescimento de bactérias láticas durante a fermentação. Aminoácidos liberados pela autólise das leveduras, monossacarídeos pela hidrólise da sacarose pela levedura e concentrações de etanol abaixo de 2% têm sido detectadas como estimulantes do crescimento bacteriano em cultura mista com leveduras durante a fermentação (Essia-Ngang et al., 1992; King; Beelman, 1986; Selby-Smith et al., 1975).

O comportamento de fermentação alcoólica (batelada alimentada) em cultivo misto de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e bactérias (*Lactobacillus fermentum*) foi estudado por Oliva-Neto e Yokoya (1996) que observaram que as leveduras foram inibidas, provocando uma redução de 14,4% na eficiência alcoólica por causa da acidez produzida pela bactéria quando 10 g/l de extrato de levedura foram adicionados ao meio, e o decréscimo na produção alcoólica é bastante significativo quando a acidez total expressa em ácido láctico/litro é de 6,0g no meio. Segundo os autores, a infecção bacteriana é estimulada pelos nutrientes (aminoácidos) que são liberados pela autólise das leveduras. Este fato se desenvolve especificamente em destilarias que operam com elevada concentração de células e baixa viabilidade das leveduras.

Um estudo realizado para avaliar quais são os nutrientes faltantes no caldo de cana que são os determinantes do crescimento de bactérias láticas na fermentação alcoólica, revelou que o estímulo do crescimento de *Lactobacillus fermentum* na fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae* em processo com reciclo de células se deve a: a) existência de competição entre estes microrganismos; b) inibição do crescimento das leveduras pela acidez produzida pelas bactérias; c) nutrientes liberados pelas leveduras após alguns ciclos estimulam o crescimento das bactérias; d) os aminoácidos são estes nutrientes (Tabela 14.1 e Gráfico 14.5), e leucina, isoleucina e valina adicionados no meio formulado com caldo de cana reidratado são fundamentais para o desenvolvimento desta bactéria, sem eles o crescimento é nulo; e) fenilalanina, alanina, ácido glutâmico, triptofano, serina e metionina estimulam o crescimento destas bactérias; f) tirosina, ácido aspártico e lisina não são essenciais e nem estimulantes. Pode-se afirmar que os aminoácidos são os principais nutrientes necessários para estimular o crescimento de *Lactobacillus* durante a fermentação alcoólica. A inibição e morte das leveduras levam a um estímulo do crescimento das bactérias contaminantes, as quais causam inúmeros prejuízos ao processo, se não forem controladas (Oliva-Neto; Yokoya, 1997)

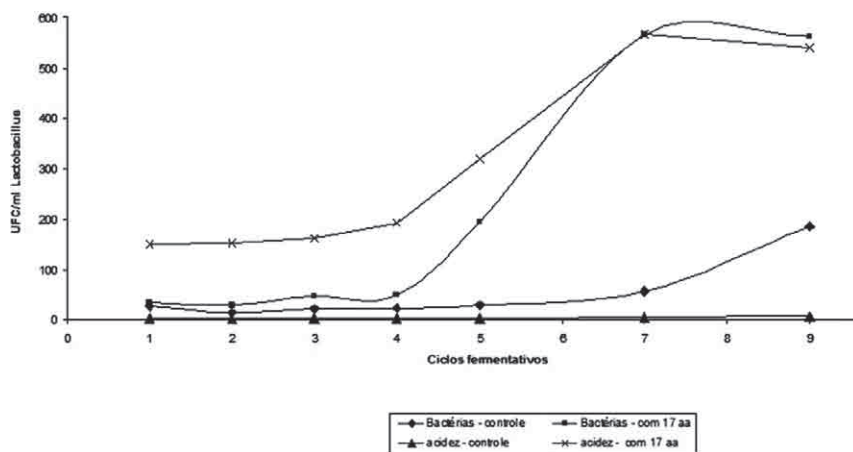
Tabela 14.1 – Efeito da suplementação de 17 aminoácidos e exclusão de um deles no meio de cultura contendo caldo de cana desidratado no crescimento de *Lactobacillus fermentum* a 30°C

Classe*	Aminoácido excluído	Lactobacillus fermentum – linhagens					
		CCT 1400		CCT 1407		CCT 0559	
		18h.	48h.	18 h.	48h.	18 h.	48 h.
1 <sup>a</sup>	aa <sup>1</sup>	+++	+++	++	+++	+++	+++
	Tyr	+++	+++	++	+++	+++	+++
	Asp	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Lys	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2 <sup>a</sup>	Ile	–	–	–	–	–	–
	Val	–	–	–	–	–	–
	Leu	–	–	–	–	–	–
3 <sup>a</sup>	Phe	++	+++	–	+++	–	+++
	Ala	–	++	–	+++	–	++
	Glu	–	+++	–	++	–	+++
	Pro	+++	+++	–	+++	+++	+++
	His	+++	+++	–	–	+++	+++
	Arg	+++	+++	–	+++	+++	+++
	Thr	–	+++	–	++	–	+++
	Trp	+++	+++	–	+++	+++	+++
	Ser	+++	+++	–	+++	+++	+++
	Met	+++	+++	++	+++	++	+++
	Cys	++	+++	++	+++	+++	+++

\* classe: 1<sup>a</sup>: a retirada de um aa não provoca nenhum efeito no crescimento; 2<sup>a</sup>: provoca ausência completa de crescimento, 3<sup>a</sup>: provoca efeito inibitório parcial no crescimento bacteriano.

Legenda: – ausência de turbidez (crescimento); ++ turbidez 0.10-0.18;

+++ acima de 0.19; aa<sup>1</sup>, conjunto de 17 aminoácidos puros conforme siglas.

Gráfico 14.5 – Efeito de 17 aminoácidos adicionados no mosto de caldo de cana, durante a fermentação alcoólica em cultivo misto *S. cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum*.

Fonte: Oliva-Neto, 1995

Outro estudo mais recente foi realizado para avaliar o antagonismo entre *S. cerevisiae* utilizado em fermentações industriais (BG-1, CAT-1, PE-2 e Fleischmann) e as bactérias contaminantes *L. fermentum*, *L. fructosus*, *L. plantarum*, em fermentações com 5 ciclos de células. A presença das bactérias praticamente não afetou a viabilidade das leveduras industriais durante os ciclos. No entanto, as linhagens bacterianas heterofermentativas (*L. fermentum* e *L. fructosus*) apresentaram melhor crescimento e maior viabilidade em cocultivo com as leveduras do que *L. plantarum*. Também na presença de *L. fermentum*, *L. fructosus* observou-se uma significativa redução no rendimento alcoólico. A produção de lactato por tais linhagens foi muito próxima e, em alguns ciclos, até maior que a produção pela linhagem *L. plantarum* FT025B. No entanto, num experimento apenas com cada uma das bactérias e uma levedura, verificou-se que, nos tratamentos com *L. plantarum* FT025B, a produção de glicerol foi menor até mesmo em relação ao controle. O autor sugere que o ácido láctico e o acético, juntamente com o etanol, podem ter agido sinergisticamente no metabolismo e crescimento das leveduras, resultando principalmente em uma diminuição do rendimento alcoólico. É também provável que as linhagens bacterianas heterofermentativas tenham sido capazes de resistir melhor aos elevados teores de etanol excretados pelas leveduras e encontrados no processo industrial, uma vez que também são capazes de produzir tal composto (Gomes, 2009).

## Controle dos microrganismos contaminantes

O controle dos microrganismos contaminantes da fermentação é a melhor maneira de evitar a floculação do fermento, já que este fenômeno está associado ao tipo e ao grau de contaminação. Entretanto este controle não é facilmente conduzido nas destilarias, o que torna comum o elevado nível de contaminações microbianas. Entre as dificuldades estão a pouca oferta de produtos que seletivamente atuem com eficiência apenas nos contaminantes, sendo inócuos para o crescimento de *S. cerevisiae*. Outra dificuldade está diretamente associada à impossibilidade de trabalhar em condições assépticas, ainda que seja feita a esterilização do mosto.

Para combater as infecções microbianas na fermentação alcoólica, faz-se necessário o uso de produtos químicos antimicrobianos na moenda e na fer-

mentação. Entre os produtos mais usados na moenda estão os biocidas quaternários de amônia e organossulfurados. Tais produtos são de uso exclusivo para a moenda, pois afetam a levedura. Para a fermentação, atualmente são usados os antibióticos monesina (Kamorán) e virginiamicina (inócuos à levedura), e o biocida dióxido de cloro que afeta *S. cerevisiae* em dosagens superiores a 50 mg/l, porém nesta dosagem a inibição de *L. fermentum* é parcial (Meneghin et al., 2008).

Além destes, já foram testados no passado inúmeros outros produtos. A penicilina foi estudada no passado como desinfetante na fermentação alcoólica de mosto de milho, promovendo um aumento de 17,5% no etanol produzido, e uma redução de 65% na acidez total do mosto fermentado (Borzani, 1957), e Aquarone (1959) verificou que 500 U/l de penicilina no mosto de melão de cana originava vinhos mais ricos em etanol e menos ácidos. Porém com o passar do tempo, o uso da penicilina contínuo em escala industrial levou a uma adaptação biológica dos contaminantes, além do fato de tratar-se de produtos muito específicos, o que limita a ação na fermentação alcoólica mista. Cruz et al. (1985) demonstraram que a adição de penicilina (500 U/L.) no mosto não foi suficiente para o controle de uma das linhagens de bactérias gram-positivas testadas por causa de alterações no equilíbrio natural da microflora contaminante.

Antibióticos e biocidas: penicilina V potássica, virgiamicina, nisina, sanicol, nasaquat, busan 881, busan 1001, busan 1212, busan 1202 foram testados em diferentes bactérias indutoras de floculação e quando aplicados isoladamente mostraram-se ineficientes no controle destas bactérias (Guerra, 1995).

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) para antibióticos de uso para bactérias mostrou que a penicilina V ácida contra *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*, tanto os isolados de destilarias produtoras de etanol, como as linhagens tipo (ATCC) foi de 0,1 a 0,2 mg/l. Cefamandole apresentou uma CMI de 0,26-0,36 mg/l para *L. fermentum*, mas foi menos eficaz para *L. mesenteroides* (0,36-1,45 mg/l). Clindamicina foi o antibiótico mais eficaz para *L. fermentum* (0,05-0,10 mg/l), porém menos eficaz contra *L. mesenteroides*, com CMI de 0,05-0,40 mg/l (Oliva-Neto; Yokoya, 2001).

Rosales (1989 apud Oliva-Neto, 1995) demonstrou que a utilização de quaternários de amônia tem efeito positivo no controle bacteriano da fer-

mentação e ainda detectou diminuição nas contagens de *Bacillus subtilis*, por meio da combinação de penicilina e quaternários de amônia.

Num estudo de biocidas (Oliva-Neto; Yokoya, 2001) de uso industrial, foram determinadas as CMI para *S. cerevisiae*, *L. fermentum* e *L. mesenteroides*, onde foram avaliados: etilenobisditiocarbamato de zinco e manganês, metilditiocarbamato, dimetilditiocarbamato, 3 metil 4clorofenol, 2 benzil 4clorofenol, o-fenilfenol, bromofenato, 2 cloro acetamida, benzil álcool formaldeído, tiocianato, n alquildimetilbenzil cloreto de amônio, formaldeído e glutaraldeído. Destes, os que mais se destacaram por ser efetivos contra as bactérias sem que afetassem a levedura foram o metilditiocarbamato que foi eficiente contra *L. fermentum* (CMI= 2,5 mg/l) e menos contra *S. cerevisiae* (CMI= 5,0 mg/l); e o formaldeído (CMI para *L. fermentum* e *L. mesenteroides* de 11,5-23 mg/l) e 46,3 mg/l para *S. cerevisiae*. Tiocianato (CMI = 1,5-5,0 mg/l), metilditiocarbamato (2,5 mg/l), bromofenato (CMI 11,5-23 mg/l) foram eficientes contra as bactérias e as leveduras, o que limita a possibilidade para uso apenas na moenda.

Oliveira et al. (1982) estudaram o desempenho do biocida de marca busan 881 (Buckmann lab.) como controlador da infecção bacteriana na fermentação em mosto de cana. Eles verificaram que este produto é mais eficiente quando colocado na fase inicial do processo, obtendo maior teor alcoólico e menor acidez em relação ao controle.

O composto 3,4,4' triclorocarbanilida (TCC) combinado com dodecil-sulfato de sódio (DDS) numa taxa 1:4 (m/m) em meio aquoso é um dos poucos biocidas que inibe seletivamente *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* (CMI <0,125-1,0 mg/l), sem inibir *S. cerevisiae*, tendo em vista que a CMI para a levedura foi muito maior (16 mg/l). 1,8 g/l de TCC foi imobilizado em alginato de sódio, e aplicado na fermentação alcoólica com índice elevado de *L. fermentum* como contaminante. Houve inibição da bactéria, controle da acidez, aumento da viabilidade da levedura e até 20,8% de aumento na eficiência alcoólica durante 8 ciclos fermentativos (Oliva-Neto; Yokoya, 1998). Estes mesmos autores realizaram outro experimento com 0,075 g/l de TCC em alginato e 1,67 mg/l DDS no mosto e não só inibiu *L. fermentum* inoculado no início do processo, como manteve estável por 24 reciclos fermentativos com o mesmo produto imobilizado (Gráfico 14.6).

Alguns estudos foram realizados no intuito de obter linhagens de leveduras que naturalmente inibam as bactérias lácticas. O estudo comparativo entre a linhagem *S. cerevisiae* M26, isolada de destilarias de etanol numa seleção de linhagens capazes de inibir *L. fermentum* (Oliva-Neto et al., 2004) produziu maior acidez que a Pe-2, com maior produção de ácido succínico, um importante inibidor de bactérias lácticas (Dorta et al., 2006).

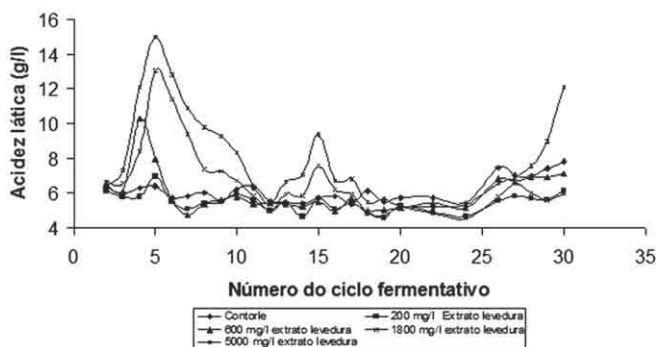


Gráfico 14.6 – Efeito da aplicação do 3,4,4' triclorescarbanilida (TCC) com 1,67 mg/l DDS no mosto de caldo de cana na redução da acidez láctica provocada por *Lactobacillus fermentum* em fermentação mista com *S. cerevisiae*.

O efeito de vários agentes antimicrobianos foi estudado contra *L. fermentum* isolado de destilarias de etanol álcool, e constatou-se que os agentes do grupo das sulfonamidas, gentamicina e polimixina não são efetivos contra esta bactéria. Os antimicrobianos ácido nalidíxico, sulfalazina, gentamicina, sulfacetamida, sulfametoxazol e trimetropim, sulfadiazina, e polimixina B apresentaram CMI superior a 40 mg/l. Nitrofurantoína foi efetiva contra *L. fermentum* com CMI = 15 mg/l e mais altas concentrações para *S. cerevisiae* (CMI >40 mg/l). O antibiótico monensina (HJ Kamoran) amplamente e comumente usado no país para controle da fermentação alcoólica foi o antibiótico de maior destaque contra *L. fermentum* (CMI 0,32 mg/l). Infelizmente, este produto tem sido detectado pelos compradores da farinha de levedura exportada como subproduto pelas destilarias de etanol, o que está limitando o uso da monensina e exigindo que alternativas sejam criadas. Os biocidas testados com maior êxito foram o TCC (3,12 mg/l), as combinações TCC com cloreto de benzetônio (3,12 mg/l) e o TCC com cloreto de benzalcônio numa proporção 1:1 que inibiu seletivamente *L. fer-*

*mentum* (CMI = 1,53 mg/l) em relação ao *S. cerevisiae* (CMI = 12,5 mg/l), o que pode ser estudado para uso tanto na moenda como na fermentação industrial para obtenção do bioetanol (Oliva-Neto et al. 2009).

O efeito de diferentes concentrações de etanol (15 a 35% v/v) foi estudado como uma alternativa ao tratamento ácido do fermento de destilarias de etanol, visando à inibição de *Lactobacillus* contaminantes do processo. As leveduras foram contaminadas com sete diferentes espécies de *Lactobacillus* para verificação de sua sensibilidade ao etanol. Nos tempos (0, 30, 60, 90 e 120 minutos), foram retiradas amostras para contagens. Os *Lactobacillus* se mostraram sensíveis ao etanol, sendo mais evidentes as concentrações maiores que 20% (v/v). A autora ainda testou a termolabilidade de *Lactobacillus* que não sobreviveu a temperaturas de fervura do caldo de cana por mais do que 4 minutos indicando que as contaminações no processo pós-tratamento térmico se devem a novas contaminações (Ceballos-Schiavone, 2009).

## Referências bibliográficas

- ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. *Scien. Agric.*, v.54, n.3, p.189-94, 1997.
- ALEXANDRE, H.; MATHIEU, B; CHARPENTIER, C. Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid. *Microbiol.*, v.142, p.469-75, 1996.
- ALMEIDA, J. R. *Álcool e destilaria*. Piracicaba, Nathanael dos Santos, v.5, p.55-85, 1940 (mimeogr.).
- ALTHERTUM, F. et al. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. *Stab Açúcar e Álcool*, v.3, n.1, p.42-9, 1984.
- ALVES da SILVA, E. F. *Fermentação etanólica: influência do ácido sulfúrico sobre a viabilidade da levedura de processo e bactérias e leveduras contaminantes*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro, p.134, 1993.
- ALVES, D. M. G. *Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica*. Tese (Doutorado). Esalq. Piracicaba, p.199, 1994.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. *Álcool e Açúcar*, v.5, p.12-4, 1981.
- ANACLETO, J.; van UDEN, N. Kinetics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulphur dioxide. *Biotech. Bioeng.*, v.34, p.2477-86, 1982.

- ANDREASON, A. A.; STIER, T. J. B. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* unsaturated fatty acid requirement for growth in defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.*, v.43, p.271-81, 1954.
- AQUARONE, E. Influência do cloranfenicol na fermentação alcoólica de melão de cana diluído. *An. Farm. Quim.*, São Paulo, v.10, p.39, 1959.
- BAFRNCOVÁ, P. et al. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, v.21, p.337-41, 1999.
- BEAVEN, M. J.; CHARPENTIER, C.; ROSE, A. H. Production and tolerance of ethanol in regulation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 451. *J. Gen. Microbiol.*, v.128, p.1447-55, 1982.
- BECHER dos PASSOS, J. B. et al. Glucose-induced activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* affected in cAMP metabolism, cAMP-dependent protein phosphorylation and initiation of glycolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1136, p.57-67, 1992.
- BENITO, B.; PORTILLO, F.; LAGUNAS, R. *In vivo* activation of the plasma membrane ATPase during nitrogen starvation. Identification of the regulatory domain that controls activation. *FEBS Lett.*, v.300, p.271-74, 1992.
- BEVAN, D.; BOND, J. Micro-organisms in field and mill: a preliminary survey. *Proc. Ad. Soc. Sugar Cane Technol.*, 38<sup>th</sup> Conference, p.137-43, 1971.
- BISSON, L.; BUTZKE, C. E. Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentation. *Am. J. Enol Vitic*, v.51, p.168-77, 2000.
- BLANPAIN, J. P. et al. The yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biolog. Chem.*, v.267, n.6, p.3735-40, 1992.
- BORZANI, W. L. O emprego de penicilina como desinfetante em fermentação alcoólica de mosto de milho. *Bol. Dept. Quim. Esc. Politécnica S. Paulo.*, v.7, p.9-11, 1957.
- BOVI, R.; MARQUES, M. O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. *Álcool e açúcar*, v.3, n.9, p.10-3, 1983.
- BOWEN, W. R.; SABUNI, H. A. M.; VENTHAN, T. J. Studies of the cell-wall properties of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Biotechn. Bioeng.*, v.40, n.11, p.1309-18, 1992.
- BRECHOT, P.; CROSON, M.; MATSURA, S. Fermentation and respiration of yeasts in presence of sulphur dioxide. *Ant. van Leeuw.*, v.35, p.21-2, 1969.
- BROMBERG, R.; YOKOYA, F. Chemical modifications of the cell-surface components of *Lactobacillus fermentum* FTPT 1405 and their effect on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *W. J. of Microbiol. Biotechnol.*, v.11, p.508-11, 1995.
- BROOKER, B. E.; FULLER, R. Adhesion of Lactobacilli to the chicken crop epithelium. *J. of Ultrastruc. Research*, v.52, p.21-31, 1975.
- BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in food: mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. Food Microbiol.*, v.174, p.125-8, 1999.
- BUTTKE, T. M.; JONES, S. D.; BLOCH, K. Effect of sterol side chains on growth and membrane fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, v.144, p.124-30, 1980.



- BUTTKE, T. M.; PYLE, A. C. Effects on unsaturated fatty acid deprivation on neutral lipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, v.152, p.747-56, 1982.
- CALLEJA, G. B. On the nature of the forces involved in the sex-directed flocculation of a fission yeast. *Can. J. of Microbiol.*, v.20, n.6, p.797-803, 1974.
- CARIGNATTO, C. R. R. et al. Imobilização da papaína em suporte de quitosana visando a desfloculação celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Congresso Latino-Americano de Microbiologia, 20, *Anais...* Montevideo. Uruguai. 2010.
- CARMELO, V.; SANTOS, H.; SÁ-CORREIA, I. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. Biophys. Acta*, v.1325, p.63-70, 1997.
- \_\_\_\_\_. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. Biophys. Acta*, v.1325, p.63-70, 1997.
- CARR, J. G.; PATRICIA, A. D.; SPARKS, A. H. The toxicity of sulphur dioxide towards certain lactic acid bacteria from fermented apple juice. *J. Appl. Bacteriol.*, v.40, n.2, p.201-12, 1976.
- CARTWRIGHT, C. P. et al. Solute Transport. In: *The Yeasts*. Ed. ROSE, A.H., Academic Press, London, v.3, p.5-56, 1989.
- CASEY, G. P.; INGLEDEW, W. M. Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Crit. Rev. Microb.*, v.13, p.219-81, 1976.
- CASEY, G. P.; MAGNUS, C. A.; INGLEDEW, W. M. High-growth brewing: effect of nutrition on yeast composition, fermentation ability, and alcohol production. *Appl. Env. Microbiol.*, v.48, n.3, p.639-46, 1984.
- CASSIO, F; LEÃO, C.; van UDEN, N. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.53, n.3, p.509-13, 1987.
- CASTELLON-VOGEL, M. A.; MENAWAT, A. S. A method to disperse aggregates of a flocculent yeast for photometric analysis. *Biotechnol. Prog.*, v.6, n.2, p.135-41, 1990.
- CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M. *Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – Lactobacillus - na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol*. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz – USP. Piracicaba. 2009.
- CHAMBEL, A.; VIEGAS; C. A.; SÁ-CORREIA, I. Effect of cinnamic acid on the growth and on plasma membrane H<sup>+</sup>- ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Internat. J. Food Microb.*, v.50, p.173-79, 1999.
- CHANG, A; SLAYMAN, C.W. Maturation of the yeast plasma membrane [H<sup>+</sup>] ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *J. Cell Biol.*, v.115, p.289-95, 1991.
- CHAPMAN, C.; BARTLEY, W. The kinetics changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria. *Bioch. J.*, v.107, p.455-65, 1968.
- CHIN, J. H.; GOLDSTEIN, D. B. Cholesterol blocks the disordering effects of ethanol in biomembranes. *Lip.*, v.19, p.929-35, 1984.

- CONWAY, P. L.; KJELLEBERG, S. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach epithelium. *J. Gen. Microbiol.*, v.135, p.1175-86, 1989.
- COOTE, N.; KIRSOP, B. H. Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. *J. Inst. Brew.*, v.82, p.149-56, 1976.
- CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CHAPPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. *Scien.*, v.233, 701-3, 1984.
- CRUZ, M. R. M. et al. Influência da penicilina V-ácida no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica. *Rev. Microbiol.*, v.16, n.2, p.138-42, 1985.
- DAESCHEL, M. A.; FLEMING, H. P.; MC FELTERS, R. F. Mixed culture fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeasts. *J. Food Scien.*, v.53, n.3, p.863-4, 1988.
- DOMBEK, K. M.; INGRAM, L. O. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl. Env. Microbiol.*, v.52, p.471-81, 1986.
- DORTA, C. et al. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, v.22, p.177-82, 2006.
- DUNCAN, C. L.; COLMER, A. R. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. *Appl. Microbiol.*, v.12, n.2, p.173-7, 1964.
- EDDY, A. A.; PHIL, M. A. D. Flocculation characteristics of yeast - I. Comparative survey of various strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.*, v.61, p.307-12, 1955a.
- . Flocculation characteristics of yeast - II. Sugars as dispersing agents. *J. Inst. Brew.*, v.61, p.313-7, 1955b.
- ; RUDIN, A. D. Part of the yeast surface apparently involved in flocculation. *J. Inst. Brew.*, v.64, p.19-21, 1957.
- EGAN, B. T. Post-harvest deterioration losses in sugar cane. In: *Queensland. Proc. Congress ISSCT, 13st.*, p.1729-34 tot, 1968.
- ERASO, P.; GANCEDO, M. Activation of Yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Letters*, Amsterdam, v.224, n.1, p.187-92, 1987.
- ESSER, K.; KUES, U. Flocculation and its implication for biotechnology. *Proc. Biochem.*, v.18, p.21-3, 1983.
- ESSIA-NGANG, J. J. E. et al. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.31, p.125-8, 1989.
- . et al. Stimulation of lactobacilli during alcoholic fermentation: action of sucrose hydrolysis by yeast. *Biotechnol. Lett.*, v.14, p.741-6, 1992.
- FERNANDES, A. R.; PEIXOTO, F. P.; SÁ-CORREIA, I. Activation of H<sup>+</sup>-ATPase in the plasma membrane of cells of *Saccharomyces cerevisiae* grown under mild copper stress. *Arch. Microbiol.*, v.171, p.6-12, 1998.

- GALLO, C. R. Contaminantes bacterianos em mosto e dornas de fermentação alcoólica. In: EGUCHI, S. Y. et al. *Pontos Críticos Microbiológicos em Usina de Açúcar e Álcool*, Campinas, Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, p.1-8, 1989.
- GAO, C.; FLEET, G. H. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. App. Bacteriol.*, v.65, p.405-9, 1988.
- GHOOSE, T. K.; TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate: batch versus continuous systems. *Biotech. Bioeng.*, v.21, p.1387-400, 1979.
- GIBBONS, W. R; WESTBY, C. A. Effects of sodium meta bisulfite on diffusion fermentation of fodder beets fuel ethanol production. *Biotechn. and Bioeng.*, v.30, p.906-16, 1987.
- GOMES, E. *Efeito do tratamento ácido da levedura Saccharomyces cerevisiae na fermentação alcoólica*. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP). Piracicaba, p.206, 1988.
- GOMES, F. S. *Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica*. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP). Piracicaba, 2009.
- GUERRA, E. J. *Isolamento de bactérias contaminantes da fermentação etanólica que induzem a floculação de Saccharomyces cerevisiae e sua sensibilidade a agentes antimicrobianos*. Rio Claro/SP: Unesp, 1995. 150p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 1995.
- GUERRA, E. J.; ANGELIS, D. F. Floculação da levedura induzida por bactérias na fermentação etanólica: I. método de detecção preventiva e estudos para o controle. *Stab: Açú. Alc. Subp.*, Piracicaba, v.16, n.6, p.25-7. 1998.
- GUTIERREZ, L. E. Efeito da adição de sulfito sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica. *Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”*, Piracicaba, v.45, n.2, p.359-68, 1988.
- HALM, M. et al. Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. *Int. J. Food Microbiol.*, v.94, n.1, p.97-103, 2004.
- . et al. Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize dough for ‘Kenkey’ production in Ghana. *Int. J. Food Microbiol.*, v.19, p.135-43, 1993.
- HOLYOAK, C. D. et al. Activity of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth in the presence of the weak acid preservative sorbic acid. *App. Environ. Microbiol.*, v.62, p.3158-64, 1996.
- HOTTINGER, T.; SCHUTZ, P.; WIEMKEN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, v.169, n.12, p.5518-22, 1987.
- HYNES, S. H. et al. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, v.18, p.284-91, 1997.
- INGRAM, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v.35B, p.235-38, 1985.

- JONES, R. P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P. F. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. *Proc. Biochemist.*, v.16, p.42-9, 1981.
- KAMATA, K.; MURATA, M. On the mechanism of brewer's yeast flocculation. *Agric. Biol. Chem.*, v.48, n.10, p.2423-33, 1984.
- KANDLER, O.; WEISS, N. Regular nonsporing Gram-positive Rods. In: SNEATH, B. et al. *Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore. Williams e Wilkens, v.2, p.1208-34, 1986.
- KIHN, J. C.; MASY, C. L.; MESDAGH, M. M. Yeast flocculation: competition between nonspecific repulsion and specific bonding in cell adhesion. *Can. J. Microbiol.*, v.34, p.773-8, 1988a.
- KING, S. W.; BEELMAN, R. B. Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *Amer. J. Enol. Vitic.*, v.37, p.53-60, 1986
- LAFON-LAFOURCADE, S.; GENEIX, C.; RIBEREAU-GAYON, P. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeasts ghosts. *Appl. Env. Microbiol.* v.47, n.6, p.1246-9, 1984.
- LEÃO, C.; van UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, v.24, p.2601-4, 1982.
- LIMA, U. A. et al. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de cana. *Brasil Açucareiro*, v.4, p.337-43, 1974.
- LOUREIRO-DIAS, M. C.; PEINADO, J. M. Effect of ethanol and other alkanols on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Lett.*, v.4, p.721-4, 1982.
- LUDWIG, K. M. *Floculação de Saccharomyces cerevisiae – caracterização e ação de enzimas desfloculantes*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.
- \_\_\_\_\_. Produção de carboidratase fúngica visando a desfloculação de células de *Saccharomyces cerevisiae* floculadas por *Lactobacillus fermentum*. Tese (Doutorado) apresentada ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, p.138, 2005.
- \_\_\_\_\_.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* Campinas, v.21, n.1, p.63-8. 2001.
- LYONS; HOUGH, 1971; Further evidence for the cross-bridging hypothesis for flocculation of brewer's yeast. *J. Inst. Brew.*, v.77, p.300-5, 1971.
- MACKENZIE, K. F.; SINGH, K. K.; BROWN, A. D. Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, v.134, n. 6, p.1661-6, 1988.
- MAIER, K.; HINZE, H.; LEUSCHEL, L. Mechanism of sulfite action on the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. Bioph. Acta*, v.848, p.120-30, 1986.

- MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, v.25, p.103-31, 1983.
- MALACRINÒ, P. et al. The vinification of partially dried grapes: a comparative fermentation study on *Saccharomyces cerevisiae* strains under high stress. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.40, p.466-72, 2005.
- MASSCHELEN, C. A. et al. Mechanism of phenotypic variations in the flocculence character of yeast. *J. Inst. Brew.*, v.69, p.332-8, 1963.
- MENEGHINI, S. P. et al. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, p.337-43, 2008.
- MIKI, B. L. A. et al. Possible mechanisms for flocculation interactions governed by gene Flo1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. of Bacteriology*, v.150, no. 2, p.878-89, 1982.
- MILL, P. J. The nature of interactions between flocculent cells in the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, v.35, p.61-8, 1964.
- MILLAR, D. et al. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnol. Lett.*, v.4, p.601-5, 1982.
- NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae* in minimal medium. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, v.26, p.171-7, 2001.
- NEVES, L. B. Tecnologia da fabricação do álcool. *Rev. Bras. Química*, v.3, p.89-134, 1938.
- NGONDI-EKOME, J. et al. Study on agglutinating factors from flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biochimie*, v.85, p.133-43, 2003.
- NISHIHARA, H.; TORAYA, T.; FUKUI, S. Effect of chemical modification of cell surface components of a brewer's yeast on the floc-forming ability. *Arch. of Microbiol.*, v.115, p.19-23, 1977.
- . Flocculation of cell walls of brewer's yeast and effects of metal ions, protein-denaturants and enzyme treatments. *Arch. Microbiol.*, v.131, p.112-5, 1982.
- NOBRE, T. P. *Viabilidade celular de S. cerevisiae cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica*. Dissertação (Mestrado). Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, Universidade de São Paulo. p.90, 2005.
- NUNES, M. A. et al. Processo de eliminação do ácido sulfúrico e outros bactericidas do sistema de fermentação alcoólica Melle-Boinot. *Álc. Açúc.*, São Paulo, v.4, n.22, p.39-50, 1991.
- OLIVA-NETO, P. *Estudos de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras*. Campinas/SP: Unicamp, 1995. 183p. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1995.
- . *Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada*. Campinas/SP: Unicamp, 1990. 207p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1990.

- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.10, p.697-9, 1994.
- \_\_\_\_\_. Influência do extrato de levedura na estabilidade da fermentação alcoólica contaminada por *Lactobacillus fermentum*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.16, n.2, p.170-4, 1996.
- \_\_\_\_\_. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. *Rev. Microbiol.*, v.28, p.25-31, 1997.
- \_\_\_\_\_. Effect of 3,4,4' trichlorocarbanilide on growth of lactic acid bacteria contaminants in alcoholic fermentation. *Bioresource Technology*, v.63, p.17-21, 1998.
- \_\_\_\_\_. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. *Braz. J. Microbiol.*, v.32, p.10-4, 2001.
- \_\_\_\_\_.; FERREIRA M. A.; YOKOYA, F. Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. *Biores. Technol.*, v.92, p.1-6. 2004.
- \_\_\_\_\_.; LIMA, F.A., SANTOS, C. Effect of chemicals in inhibition of the growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum* from industrial fuel bioethanol production. *Abstract of 14<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology*. Barcelona – Espanha, p.S209. 2009.
- OLIVEIRA, M. C.; FURLETTI, M. E.; ANGELIS, D. F. Novos biocidas propostos a indústria alcooleira (I) Análise do desempenho do Busan 881. *Simpósio Nacional de Fermentação*, 5, Universidade Federal de Viçosa – MG, 1982.
- OLIVEIRA, M. C. F. L. Leveduras contaminantes da fermentação etanólica. *Microbiologia da Fermentação Etanólica*. Rio Claro. SP. Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IB – Unesp, p.92-104, 1987.
- OLIVEIRA-FREGUGLIA, R. M.; HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. *Scien. Agric.* v.55, n.3, Piracicaba. 1998.
- OTÊNIO, M. H. Avaliação comparativa do efeito da retirada do tratamento ácido com ácido sulfúrico no fermento durante os ciclos, na Usina Bandeirantes, PR, na rotina industrial da Destilaria Anexa. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. p.69, 1998.
- PANEK, A. C. et al. Regulation of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* mutants during temperatures shifts. *Bioch.*, v.72, p.77-9, 1990.
- PANEK, A. D. Storage carbohydrates. *The Yeasts*, Ed. ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. Academic Press, v.4., p.655-78, 1991.
- \_\_\_\_\_. Trealose synthesis during starvation of baker's yeast. *Eur. J. App. Microb.*, v.2, p.39-46, 1975.
- PATARO, C. et al. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeast isolated from 24 fermentation cycles during the production of artisanal brazilian cachaça. *Braz. J. Microbiol.*, v.33, p.202-8, 2002.

- PATERSON, M. et al. Avaliação do desempenho da fermentação etanólica em diferentes situações do processo industrial. *Brás. Açuc.*, v.106, n.516, p.27-32, 1988.
- PORTER, A. M.; MACAULAY, R. J. Studies on flocculation – I. A relationship between the pH and calcium content of the growth medium. *J. Inst. Brew.*, v.71, p.175-9, 1965.
- RODINI, M. A. *Isolamento caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol*. Piracicaba/SP: USP, 1985. 92p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1985.
- ROSA, H. *Técnicas de reciclo de protease visando a desfloculação celular de Saccharomyces cerevisiae*. Rio Claro/SP. Unesp, 2008, 98p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2008.
- ROSA, M. F.; SÁ-CORREIA, I. *In vivo* activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.57, p.830-5, 1991.
- ROSALES, S. Y. R. *Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes*. Rio Claro/SP: Unesp, 1989, 200p. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 1989.
- ROSE, A. H. Industrial importance the *Saccharomyces cerevisiae*. In: SKINNER, F.A. et al. *Biology and Actives of Yeast*, Ed. Academic Press, 1980.
- SAMSOM, F. E.; KATZ, A. M.; HARRIS, D. L. Effects of acetate and short-chain fatty acids on metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.54, 406, 1955.
- SANTOS, M. T.; YOKOYA, F. Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. *J. Ferment. Bioeng.*, v.75, n.2, p.151-4, 1993.
- SELBY-SMITH, J. et al. The nature of the growth of *Streptococcus lactis* on yeast extract. *J. Dairy Res.*, v.42, p.123-38, 1975.
- SERRA, G. E. et al. Contaminação da fermentação alcoólica: floculação do fermento. *Brasil Açucareiro*, v.93, n.6, p.336-41, 1979.
- . et al. Contaminação da fermentação alcoólica: floculação do fermento. *Brasil Açucareiro*, v.XCIII, n.6, p.336-41, 1979.
- SHARMA, S.; TAURO, P. Enzyme behavior during ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *W. J. Microb. Biothechnol.*, v.2, p.112-5, 1987.
- SHARMA, S. C. A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.152, p.11-5, 1997.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, v.246, p.227-46, 1989.
- SILVA, D. F. et al. Imobilização covalente multipontual da enzima papaína em agarose-glioxil e sabugo de milho-glioxil. Encontro de Engenharia Biotecnológica e Biociências de Assis, 10, *Anais...* 2010.
- SILVA, N. da. *Influência do resfriamento em torre sobre a microbiota do caldo de cana no processo de produção de álcool*. Campinas/SP: Unicamp, 1988. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1988.

- SILVA, R. B. O. Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: Quantificação e identificação. Dissertação. Rio Claro – Unesp. p.145, 1994.
- SOUZA, M. A. A.; TRÓPIA, M. J.; BRANDÃO, R. L. New aspects of glucose activation of the H<sup>+</sup>-ATPase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.*, v.147, p.2849-55, 2001.
- STEWART, G. G.; RUSSEL, I.; GARRISSON, I. F. Some considerations of the flocculation characteristics of ale and large yeast strains. *J. Inst. Brew.*, v.81, p.248-57, 1975.
- STRATFORD, M. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v.5, p.441-5, 1989.
- \_\_\_\_\_. Induction of flocculation in brewing yeast by change in pH value. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.136, p.13-8, 1996.
- \_\_\_\_\_.; BRUNDISH, H. M. Yeast flocculation: cationic inhibition. *Yeast*, v.6, p.77-86, 1990.
- \_\_\_\_\_.; KEENAN, M. H. J. Yeast flocculation: quantification. *Yeast*, v.4, p.107-15, 1988.
- TAYLOR, N. W.; ORTON, W. L. Aromatic compounds and sugar in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.*, v.84, p.113-4, 1978.
- THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Reviews*, v.48, p.42-59, 1984.
- THOMAS, D. S.; KOSSAK, J. A.; ROSE, A. H. Plasma membrane composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microb.*, v.117, p.239-45, 1978.
- THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. *J. App. Microbiol.* v.90, p.819-28, 2001.
- TILBURY, R. H. Occurrence and effect of lactic acid bacteria in the sugar industry. In: CARR et al *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. New York, Academic Press, 1975, p.177-91.
- \_\_\_\_\_. et al. Mill sanitation: a fresh approach to biocide evaluation. In Reis, F.S.; Dick, J. (Eds.). *Proceedings XVI Congress of Int. Soc. Sugar Cane Technology*. 1977.
- VICTOR, S. R. *Tolerância Térmica, Etanólica e a tratamentos por ácido láctico e Sulfúrico em S. uvarum IZ 1904, S. cerevisiae IZ 888 e leveduras contaminantes da Fermentação Etanólica*. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, p.190, 1996.
- VIEGAS, A. C.; SÁ-CORREIA, I. Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *J. Gen. Microbiol.*, v.137, p.645-51. 1991.
- \_\_\_\_\_. Effects of low temperatures (9-33°C) and pH (3,3-5,7) in the loss of *Saccharomyces cerevisiae* viability by combining lethal concentrations of ethanol with octanoic and decanoic acids. *Food Microbiol.*, v.34, p.267-77, 1997.
- VIEGAS, C. A. et al. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Appl. Environ. Microb.*, v.55, n.1, p.21-8, 1989.



- \_\_\_\_\_. et al. The H<sup>+</sup>-ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated growth latency in octanoic acid supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and viability. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.64, p.779-83, 1998.
- \_\_\_\_\_. et al. Activation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at supraoptimal temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, n.5, p.1904-9, 1995.
- WARTH, A. D. Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide. *J. Food Protect.* v.48, n.7, p.564-69, 1985.
- WEUSTHUIS, R. A. et al. Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. *Microbiol.*, v.140, p.703-15, 1994.
- YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na Fermentação alcoólica. *Stab: álcool e açúcar*, julho/agosto, 1991.
- \_\_\_\_\_.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Rev. Microb.*, v.22, n.1, p.12-6, 1991.
- ZECH, M.; GÖRISCH, H. Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: reversible activation by components of industrial molasses media. *Enz. Microb. Technol.*, v.17, p.41-6, 1995.

## **Parte III**

# Utilização de bioenergia



## 15

# Combustível renovável em trator agrícola: experiências na utilização de biodiesel<sup>1</sup>

*Afonso Lopes, Gilberto Hirotsugu Azevedo Koike,  
Leomar Paulo de Lima, Miguel Joaquim Dabdoub,  
Felipe Thomaz da Câmara, Melina Cais Jecic de Oliveira,  
Murilo Coelho Theodoro Neves*

## Introdução

Este capítulo apresenta uma introdução sobre motores de combustão interna, biodiesel em geral e biodiesel em aplicação direta em motores de ignição por compressão.

## Histórico da evolução dos motores de combustão interna

Segundo Martins (2006), os primeiros trabalhos visando ao desenvolvimento de veículos automotores foram realizados no século XVIII simultaneamente por várias pessoas em diversos países. Credita-se, no entanto, ao francês Nicolas Cugnot o primeiro veículo a andar por meio de sua própria energia, em 1769.

Em 1860, o francês Etienne Lenoir construiu o primeiro motor de combustão interna importante. Esse motor era constituído de um só cilindro, no qual era injetado gás primeiro em uma extremidade e depois na outra. O êmbolo era jogado de uma extremidade para a outra pelas explosões provocadas por centelha elétrica. Uma haste articulada no êmbolo em um volante fazia

---

<sup>1</sup> Os autores agradecem à Fapesp e ao CNPq.

este último girar. Em 1862, outro francês, Alphonse Beau de Rochas, publicou a análise termodinâmica do novo motor, estabelecendo o princípio do ciclo de quatro tempos. Em 1876, os alemães N. A. Otto e Eugen Langen aplicaram com sucesso esse princípio, vendendo cerca de 35 mil motores por todo o mundo para instalação em pequenas fábricas. O ciclo de quatro tempos, ainda hoje, é o princípio básico da maioria dos motores de combustão interna sendo empregado na quase totalidade dos veículos automotores atuais.

Em 1885, o alemão Karl Benz colocou pela primeira vez na estrada um veículo equipado com motor de combustão interna de razoável segurança e por isso alguns o consideraram o “pai do automóvel”.

Foi, porém, em 1886, com o alemão Gottlieb Daimler, patenteando um motor de combustão interna de alta rotação, que o automóvel se mostrou realmente viável.

Em 1893, os irmãos Charles e Frank Duryea, dos Estados Unidos, construíram uma carruagem com motor a gasolina de 4 cv e velocidade de 15 km/h. Levassor Krebs revolucionou o desenho do automóvel, em 1894, projetando o Panhard com motor vertical, montado na dianteira e protegido por um capuz sobre um quadro de chassi que se tornou clássico.

O outro tipo importante de máquina térmica é o motor diesel, inventado por Rudolf Diesel e patenteado em 1892. A atividade do mecanismo é originada pela compressão do ar e do combustível até ao ponto em que a mistura, no interior da câmara de combustão, atinge uma pressão e uma temperatura suficientes para provocar a explosão. Uma vez que o arranque se processe, o motor continua a rodar por si próprio, desde que o fluxo de ar e de combustível não seja interrompido. O diesel é um óleo derivado do petróleo e mais pesado quando comparado com a gasolina.

### **Importância dos motores de ignição por compressão (ciclo diesel)**

Em relação aos meios mecânicos de grande envergadura, a opção pelos motores diesel é inevitável. Os grandes construtores dedicam-se ao desenvolvimento desses mecanismos, tentando sempre combater os níveis de poluição.

No mar, é de prever que o diesel continue a ser utilizado, porque para obter grandes potências, só recorrendo a combustíveis alternativos, como a energia nuclear, o que iria trazer problemas adicionais.

Também o transporte ferroviário não pode passar sem as históricas locomotivas a diesel. Não há dúvida de que os comboios elétricos são silenciosos e não poluentes, representando a solução ideal para percursos urbanos ou em zonas altamente povoadas, mas os elevados custos da eletrificação das vias levantam a questão de que as longas distâncias a serem percorridas podem ser mais facilmente vencidas com as locomotivas a diesel.

### **Poluição atmosférica gerada por motores de combustão interna**

Juntamente com as máquinas térmicas vieram os problemas com a poluição atmosférica. Segundo Macedo (2005), o suprimento mundial de energia é baseado em combustíveis fósseis (75%); a escala de uso leva rapidamente ao esgotamento das fontes, deixando uma pesada carga adicional para as gerações futuras. Adicionalmente, o uso de combustíveis fósseis é responsável por grande carga de poluição local e pela maior parte da emissão de gases de efeito estufa. O desafio atual é a busca de fontes renováveis de energia e de aumento na eficiência de geração e uso.

A mudança global do clima é um dos mais graves problemas ambientais do século, que traz consequências possivelmente catastróficas. Esse problema vem sendo causado pela intensificação do efeito estufa, que por sua vez está relacionado ao aumento da concentração, na atmosfera da terra, de gases que possuem características específicas. Esses gases permitem a entrada da luz solar, mas impedem que parte do calor no qual a luz se transforma volte para o espaço. Esse processo de aprisionamento do calor é análogo ao que ocorre em uma estufa, daí o nome atribuído a esse fenômeno e também aos gases que possuem essa propriedade de aprisionamento parcial de calor, chamados de Gases de Efeito Estufa (GEE), dentre os quais se destaca o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (Pereira, 2003). Na Figura 15.1, esquematiza-se o efeito estufa.

Segundo Pereira (2003), é importante notar que o  $\text{CO}_2$ , bem como os outros GEE em geral (vapor d'água, por exemplo) não possuem as características básicas de um poluente. Deve-se ressaltar também que o efeito estufa é um fenômeno natural e bem-vindo, pois sem ele o Sol não conseguiria aquecer a Terra o suficiente para que ela fosse habitável. No entanto, a intensificação desse efeito é de fato um problema, e sua principal causa é

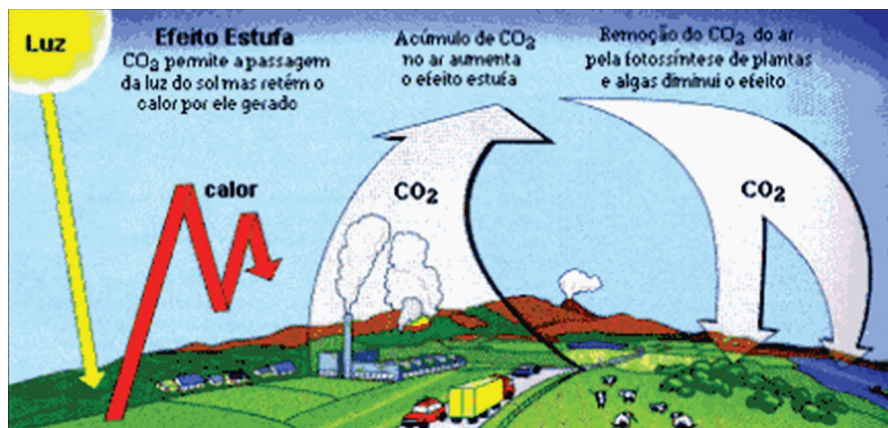


Figura 15.1 – Efeito estufa

Fonte: Mossmann, 2003

a queima de combustíveis fósseis. Com a Revolução Industrial e o advento do motor de combustão interna, as emissões de GEE decorrentes da queima desses combustíveis vêm aumentando de forma abrupta. É justamente esse aumento da concentração de GEE na atmosfera que vem causando a intensificação do efeito estufa. Esse calor adicional tem uma influência determinante sobre o funcionamento do clima do planeta, já que essa energia é responsável pela circulação dos ventos e dos oceanos, pela evaporação e pela precipitação.

Na Figura 15.2, ilustra-se o comportamento do efeito estufa com a emissão de gases provocada por motores que utilizam combustíveis fósseis.

Uma maneira de se neutralizar o efeito estufa é a utilização de combustíveis renováveis, tais como o etanol e o biodiesel. O  $\text{CO}_2$  gerado na combustão seria consumido na fotossíntese da planta que daria origem ao combustível.

Na Figura 15.3, ilustra-se o comportamento do efeito estufa com a emissão de gases provocada por motores que utilizam combustíveis renováveis.

Em motores de ignição por centelha existem tecnologias que vêm sendo desenvolvidas há décadas, e desde o final dos anos 1970 já são comercializados automóveis movidos a etanol.

Para motores de ignição por compressão, não há ainda sistemas eficazes para a utilização de combustíveis alternativos que auxiliariam na diminuição do efeito estufa e na emissão de poluentes.



Figura 15.2 – Efeito estufa

Fonte: Joseph Jr., 2003



Figura 15.3 – Efeito estufa

Fonte: Joseph Jr, 2003



## Biodiesel em motores

Especificamente para o motor diesel, na Europa e nos Estados Unidos, o combustível alternativo foi denominado como diesel vegetal ou simplesmente biodiesel, definido pela National Biodiesel Board como uma mistura de monoalquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis, como óleos vegetais ou gordura animal, utilizado em substituição, parcial ou totalmente, aos combustíveis fósseis em motores do ciclo diesel (NBB, 2002).

No Brasil, a literatura retrata o assunto biodiesel, oriundo da iniciativa de instituições de ensino e/ou pesquisa, como é o caso do grupo da Universidade Federal do Ceará (UFC) que, entre outros fatos, relata a organização de um Seminário Internacional de Biomassa, realizado em Fortaleza, em 1978, e o depósito da primeira patente brasileira de biodiesel denominada “PI-8007957 de 1980” (Parente, 2003). Outros grupos, igualmente importantes, surgiram em várias instituições, como é o caso de Ufla, Embrapa, Coppe-UFRJ, UFPR e a parceria entre a USP de Ribeirão Preto e a Unesp de Jaboticabal, além de outros centros, por ora não citados, como é o caso da iniciativa privada. Com o avanço tecnológico relacionado ao processo de produção do biodiesel e a maciça cobertura da imprensa, os diversos segmentos políticos ficaram atentos, até mesmo demonstrando apoio e tratando da parte de legislação. A exemplo disso, em 2004, o governo federal anunciou o Polo de Biocombustível para Pesquisa e Desenvolvimento, na cidade de Piracicaba (SP), assim como, no dia 29 de junho de 2004, a Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, por meio da Resolução SAA-13, designou os membros da Câmara Setorial de Biocombustíveis (São Paulo, 2004).

Dabdoub (2004) ressaltou a importância dos vários centros envolvidos no Programa Biodiesel, bem como afirmou que a adoção do biodiesel resultaria no aumento da área plantada e, conseqüentemente, na criação de novos postos de trabalho. A exploração de plantas oleaginosas com o objetivo de produzir combustíveis é questionada em países de pequena extensão territorial, por causa da concorrência com o cultivo destinado aos alimentos. Tal fato não se constitui em problema para a agricultura brasileira, pois o país tem 851,4 milhões de hectares de extensão territorial, com aproximadamente 500 milhões potenciais e apenas 58 milhões de hectares

ocupados para fins agrícolas, destacando-se que as condições climáticas são favoráveis para essa finalidade (IBGE, 2006).

Dentre as vantagens do biodiesel, destaca-se o fato de que as propriedades físico-químicas são semelhantes às do diesel mineral, podendo substituí-lo sem exigir alterações no motor ou outro tipo de adaptação, além de reduzir a emissão de poluentes para a atmosfera (Santos et al., 2004). Os autores mencionaram que a grande desvantagem do biodiesel é o preço, uma vez que o diesel mineral ainda é mais barato, talvez por questão de escala de produção ou por decisão política, lembrando-se de que, no Brasil, o diesel tem incentivo financeiro governamental. Visto isso, Lopes et al. (2004b) ressaltaram que o êxito do Programa Biodiesel dependia do maciço apoio governamental e privado.

De acordo com o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, além da relevância econômica e ambiental, esse biocombustível abrange o aspecto social, pois a cadeia produtiva do biodiesel tem grande potencial de geração de empregos, podendo promover, dessa forma, a inclusão social, especialmente quando se considera o amplo potencial produtivo da agricultura familiar.

A implementação do biodiesel no Brasil vem ao encontro de outra tecnologia bem-sucedida, o álcool combustível produzido com cana-de-açúcar, o etanol. Destaca-se, também, que para a produção de biodiesel necessita-se de grande quantidade de álcool (uma das matérias-primas) e, para produzir esse álcool, utiliza-se grande quantidade de diesel, o qual está diretamente relacionado ao funcionamento dos equipamentos e ao transporte que engloba uma cadeia produtiva que pode ser substituída por biodiesel. Além disso, o uso dessa alternativa energética aponta para um importante crescimento do agronegócio brasileiro em decorrência do aumento da área plantada e da geração de empregos. Outro ponto importante relacionado ao biodiesel é a redução da emissão de poluentes para a atmosfera, assim como a transformação de óleo residual de frituras em combustível, minimizando o efeito desse sobre o solo e os cursos d'água (Lopes, 2004a).

Dois biocombustíveis de relevada importância para o país são o biodiesel de soja e o de amendoim.

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), apesar de conhecida e explorada há mais de cinco mil anos, teve o seu cultivo ignorado no Ocidente até a segun-

da década do século XX, quando os Estados Unidos iniciaram a exploração comercial, primeiro como forrageira e, posteriormente, como grãos. O pico do cultivo como forrageira aconteceu em 1940, alcançando, naquele país, cerca de dois milhões de hectares, sendo reduzido rapidamente a partir de 1941, até desaparecer em meados da década de 1960. Da mesma forma que diminuiu o cultivo forrageiro, a área cultivada para a produção de grãos cresceu de forma exponencial, não apenas nos Estados Unidos, como também na América do Sul, destacando-se o Brasil e a Argentina. Em 2003, o Brasil já era o segundo maior produtor mundial, somando 52 (26,6%) das 194 milhões de toneladas da safra mundial (Embrapa, 2003).

De acordo com o Agriannual (2006), até 2014, é previsto o crescimento da produção mundial, sustentado especialmente pelo aumento da produção no continente sul-americano, em especial no Brasil e na Argentina.

O Brasil é o país que apresenta as melhores condições para expandir a produção e prover o esperado aumento da demanda mundial, pois detém, apenas no ecossistema dos cerrados, mais de 50 milhões de hectares de terras não utilizadas e aptas para o processo produtivo da soja. Com exceção da Argentina, que ainda poderá crescer até o limite de 10 milhões de hectares, a área cultivada com soja nos Estados Unidos, na China e na Índia só aumentará se reduzir a área de outros cultivos. Embora o Brasil seja considerado o segundo maior produtor, o custo médio de transporte é alto, pois se baseia no sistema rodoviário, sendo ele mais oneroso se comparado ao ferroviário, e esse, maior que o hidroviário. Como comparação, 16% da soja americana são transportados por rodovias, contra 67% da brasileira. Em contrapartida, 61% da soja americana viajam por hidrovias, contra 5% da brasileira (Embrapa, 1999).

O preço da soja é controlado pela bolsa de valores de Chicago (Estados Unidos), destacando que a China, maior consumidora mundial, tem os Estados Unidos como maior fornecedor; e em virtude de aquele país escoar a produção pelo Pacífico, tal procedimento resulta em economia de R\$ 13,2 (US\$ 6,0) por tonelada, comparado ao produto importado da América do Sul (Agriannual, 2006).

No sistema de produção da cana-de-açúcar em São Paulo, é preconizado, por ocasião da renovação dos canaviais, o cultivo de culturas graníferas leguminosas (soja e amendoim) com o objetivo de gerar receita e propor-

cionar os benefícios da rotação de culturas. Considerando que a cana-de-açúcar nesse estado ocupa área em torno de 2,8 milhões de hectares e que, geralmente, 350 mil hectares são destinados à renovação, a cultura da soja surge como expressiva alternativa (Tanimoto, 2002).

Os grãos de soja contêm de 13% a 22% de óleo, sendo a média aproximada de 18%, por isso a planta se destaca como relevante oleaginosa, cujo óleo tem coloração amarelo-áurea (Gomes, 1990). Além do uso culinário, o óleo da soja tem novo uso industrial, que é a produção de biodiesel (Embrapa, 2003).

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.), da família Fabaceae, é planta originária da América do Sul, na região compreendida entre o Amazonas e a Argentina, entre as latitudes de 10° e 30° sul, com provável centro de origem na região de Gran Chaco (Argentina), incluindo-se os vales dos Rios Paraná e Paraguai (Centurion; Centurion, 1998). Ressalta-se, também, que tal oleaginosa é cultivada em larga escala na Índia, na China, na África, no sul dos Estados Unidos, na Indonésia e em diversos países da América Latina, entre os quais se destaca o Brasil. No país, São Paulo produz 90% do amendoim consumido, utilizando recursos tecnológicos comparados às regiões do Primeiro Mundo. Nesse estado, a produtividade média do cultivo de primavera-verão ultrapassa 2.000 kg ha<sup>-1</sup>, podendo ser encontrada produtividade entre 3.000 e 4.000 kg ha<sup>-1</sup>. Em São Paulo, os autores afirmam, ainda, que as regiões de Ribeirão Preto e de Marília se destacam como as maiores produtoras, evidenciando-se que, na região de Ribeirão Preto, o amendoim assume especial importância, em razão do ciclo curto, constituindo-se na principal alternativa na reforma dos canaviais.

Cerca de oito milhões de toneladas anuais de grãos de amendoim destinam-se ao consumo como alimento *in natura* ou industrializado, e 15 a 18 milhões são esmagados para fabricação de óleo (Godoy, 2001).

Aproximadamente 10% da produção mundial de óleo comestível são extraídos do amendoim. O óleo, refinado e purificado, é largamente utilizado também na indústria farmacêutica, como diluente para diversos tipos de medicamentos. O óleo não refinado serve como combustível para lâmpadas dos operários de minas e é matéria-prima para a indústria de sabões e de lubrificantes. Com a extração do óleo, que representa 45% a 50% dos grãos,

o bagaço também é aproveitado na forma de torta (Martin, 1987). O autor esclarece a importância de conhecer o ponto exato de maturação da espécie, pois, quando o ciclo é completo, coincide com a maior quantidade de óleo, característica importante para a indicação da oleaginosa para a produção de biodiesel.

Existe relevante importância econômica do amendoim no mundo contemporâneo; sendo assim, o preço do óleo é regulado pela demanda do mercado internacional, sendo a Cooperativa de Plantadores de Cana da Região de Guariba, São Paulo (Coplana), responsável por 40% das exportações nacionais (Globo Rural, 2004).

### **Resultados de ensaios de motores de ignição por compressão utilizando biodiesel de soja: recuperação de potência com etanol hidratado**

Koike (2008) efetuou medições de potência, consumo e emissões em um motor do ciclo diesel utilizando diesel, biodiesel etílico de soja e etanol hidratado em conjunto com biodiesel etílico de soja. A cronologia efetuada foi: levantamento das curvas de torque, de potência e de consumo específico a plena carga, utilizando diesel e biodiesel de soja. Depois, injetou-se etanol hidratado em paralelo com biodiesel até o motor atingir a potência semelhante àquela quando movido a diesel.

Em seguida, realizaram-se os testes de emissões utilizando-se o diesel como combustível, depois biodiesel e, por último, etanol em conjunto com biodiesel.

O passo seguinte foi a medição da opacidade, utilizando-se de diesel e injeção de etanol hidratado em conjunto com diesel.

O esquema do experimento está ilustrado na Figura 15.4.

O ensaio foi efetuado com um motor gerenciado eletronicamente, marca Mercedes Benz, modelo OM-924 LA, ciclo diesel de injeção direta, turbocooler, quatro cilindros verticais em linha, potência máxima líquida de 160 kW (218 cv) a 2.200 rpm, 4.800 cm<sup>3</sup> de cilindrada total, torque máximo de 810 Nm (83 mkgf) de 1.400 a 1.600 rpm, e consumo específico mínimo de 202 g/kWh (149 g/cvh) a 1.600 rpm.

O dinamômetro utilizado foi da marca Nabla, modelo 450 SP, com escala de 0 a 450 kgf e resolução de 1 kgf. O tacômetro apresenta escala de 0 a 4.000 rpm e resolução de 100 rpm. O referido equipamento está ilustrado na Figura 15.5.

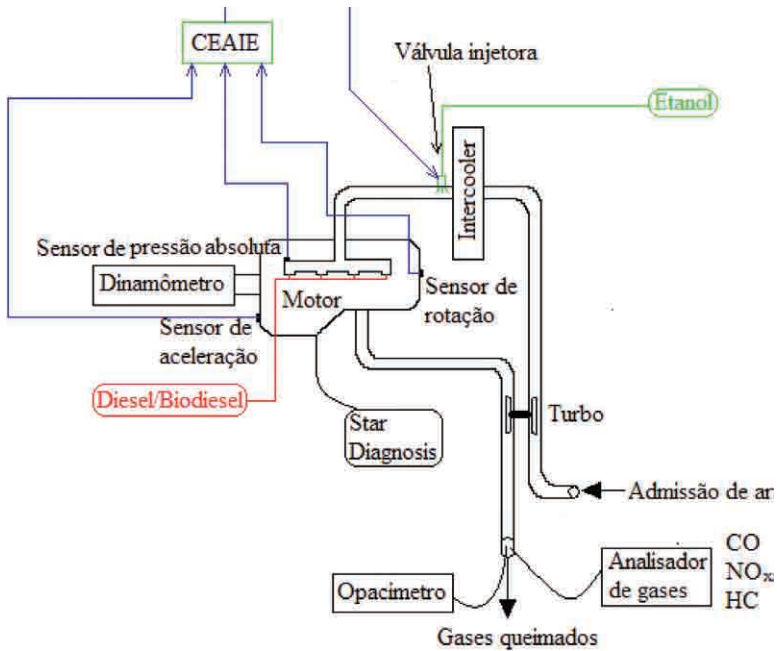


Figura 15.4 – Sistema montado para realização do experimento.



Figura 15.5 – Dinamômetro acoplado ao motor MB OM 924 LA.

## Medições de potência, torque e consumo com óleo diesel como combustível

Realizaram-se medições de potência e de consumo, utilizando-se o óleo diesel como combustível, com o motor a plena carga. Mediram-se, também, a pressão atmosférica, a temperatura de bulbo úmido e a temperatura de bulbo seco para realizar a correção de potência, cujos valores encontrados foram 95,5 kPa, 24 °C e 31 °C, respectivamente. Efetuando-se as contas pela ISO 1585, o fator de correção de potência foi 1,060711 para aquelas condições. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 15.1.

Tabela 15.1 – Medição de torque utilizando diesel como combustível

Rotação (rpm)	Torque lido (Nm)	Potência (cv)	Potência corrigida (cv)	Potência corrigida (kW)	Consumo de diesel (kg/h)	Consumo específico (g/kWh)
1.000	343	35	37	27	8,42	309
1.100	588	66	70	51	14,70	286
1.300	981	130	138	101	25,04	247
1.500	1.010	158	167	123	27,62	225
1.700	1.049	179	189	139	31,34	226
1.900	971	190	202	148	33,97	230
2.000	932	190	202	148	35,88	243
2.200	843	187	198	146	37,01	254
2.300	735	173	183	134	35,99	268
2.400	588	144	153	112	32,66	291
2.500	294	75	80	58	18,00	308

## Medições de potência, torque e consumo com biodiesel etílico de soja

Realizaram-se medições de potência e de consumo, utilizando-se o biodiesel etílico de soja como combustível, com o motor a plena carga. Mediram-se, também, a pressão atmosférica, a temperatura de bulbo úmido e a temperatura de bulbo seco para realizar correção de potência, cujos valores encontrados foram 95,5 kPa, 23 °C e 30 °C, respectivamente. Efetuando-se as contas pela ISO 1585, o fator de correção de potência foi 1,055691 para essas condições. Os resultados estão na Tabela 15.2.

Tabela 15.2 – Resultados do ensaio utilizando biodiesel etílico de soja

Rotação (rpm)	Torque lido (Nm)	Potência (cv)	Potência corrigida (cv)	Potência corrigida (kW)	Consumo de diesel (kg/h)	Consumo específico (g/kWh)
1.000	314	32	34	25	9,07	366
1.100	549	62	65	48	15,50	325
1.300	912	121	128	94	26,00	278
1.500	981	150	158	116	26,91	232
1.700	961	167	176	129	31,22	242
1.900	883	171	181	132	34,48	260
2.000	863	176	186	136	38,68	284
2.200	765	172	181	133	40,41	304
2.300	677	159	168	123	39,99	325
2.400	549	134	142	104	36,27	348
2.500	275	70	74	54	20,09	370

### Comparações gráficas entre potência e consumo específico utilizando diesel e posteriormente biodiesel como combustível

No Gráfico 15.1, apresenta-se a potência obtida tendo diesel e depois biodiesel como combustível.

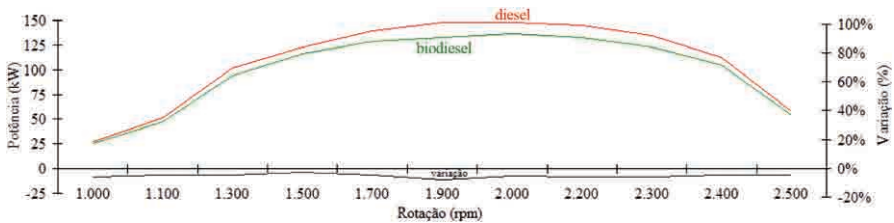


Gráfico 15.1 – Gráfico comparando potências do motor movido a diesel e biodiesel.

Quando o motor está funcionando com biodiesel, a potência é menor em todas as rotações (a plena carga), comparando-se quando está funcionando com diesel.

Isso é explicado pelo menor poder calorífico do biodiesel em comparação com o diesel (considerando-se que não houve ajustes no sistema de injeção).



No Gráfico 15.2, compara-se o consumo específico obtido tendo diesel e depois biodiesel como combustível, no teste a plena carga.

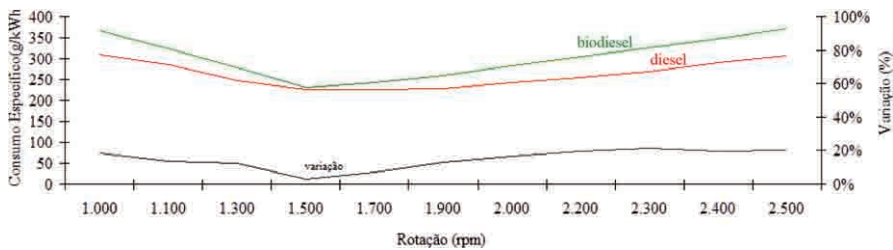


Gráfico 15.2 – Gráfico comparando consumos específicos do motor movido a diesel e biodiesel

Nesse caso, o consumo específico do biodiesel é maior que o do diesel em todas as rotações. A explicação para o ocorrido se deve ao menor poder calorífico do biodiesel etílico de soja em relação ao diesel fóssil.

### Medições de consumo quando da injeção de etanol hidratado em conjunto com biodiesel de soja

Realizou-se a injeção de etanol em paralelo com o biodiesel de soja para que o motor atingisse, nas mesmas faixas de carga e de rotação, o mesmo torque de quando movido a diesel. Mediram-se, também, a pressão atmosférica, a temperatura de bulbo úmido e a temperatura de bulbo seco para realizar a correção de potência, cujos valores encontrados foram 95,5 kPa, 24°C e 31°C, respectivamente. Efetuando-se as contas pela ISO 1585, o fator de correção de potência foi 1,060711 para aquelas condições. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15.3.

Independentemente da rotação, o consumo de etanol foi constante para cada torque que deveria ser acrescentado ao motor. Os valores repetidos foram 4 e 7 kgf, e os volumes de etanol necessários para produzir essa força foram 0,50 e 0,80 g/s. Pode-se explicar o fato em razão de o motor trabalhar com mistura pobre, em todas as faixas de rotação, na carga testada. O etanol hidratado foi completamente consumido nessa situação.

Observou-se, também, que a relação de torque pretendido e o consumo de etanol é linear.

No Gráfico 15.3, apresenta-se a relação entre consumo de etanol (kg/h) e torque pretendido (kgf). A linha de tendência está pontilhada e é linear.

Tabela 15.3 – Medição de consumo na adição de etanol hidratado em conjunto com biodiesel de soja

Rotação (rpm)	Torque biodiesel (kgf)	Torque pretendido (kgf)	Diferença de torque (kgf)	Consumo de etanol (g/s)	Consumo de etanol (kg/h)
1.000	32	35	3	0,37	1,32
1.100	56	60	4	0,50	1,80
1.300	93	100	7	0,89	3,20
1.500	100	105	5	0,67	2,40
1.700	98	105	7	0,89	3,20
1.900	90	100	10	1,28	4,60
2.000	88	95	7	0,89	3,20
2.200	78	85	7	0,89	3,20
2.300	69	75	6	0,81	2,90
2.400	56	60	4	0,50	1,80
2.500	28	30	2	0,23	0,84

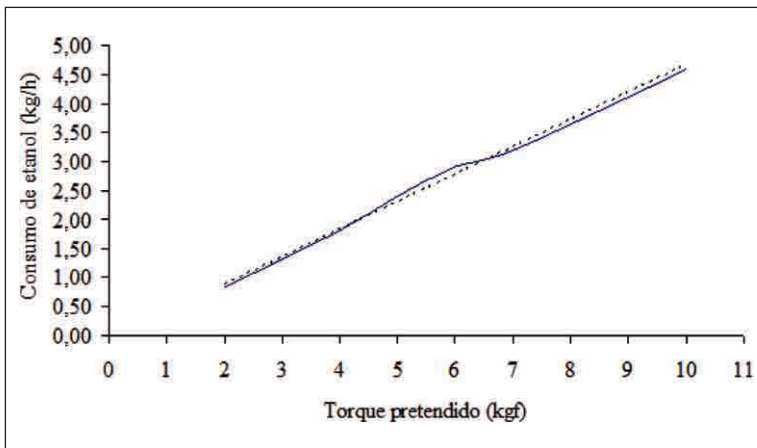


Gráfico 15.3 – Gráfico de consumo de etanol (kg/h) x torque (kgf).

## Medições de emissões

### Emissões de CO<sub>2</sub>, HC e NOx

Efetuaram-se as medições de emissões utilizando-se os três combustíveis: diesel, biodiesel etílico de soja e etanol em conjunto com biodiesel etílico de soja. Foram realizadas três medições para cada combustível. A Norma adotada para as medições foi a NBR 14489.

### Medições de emissões utilizando diesel como combustível

Os valores médios obtidos de emissões com o óleo diesel como combustível estão apresentados na Tabela 15.4.

Tabela 15.4 – Medição de emissões de poluentes no motor quando movido a diesel

Ponto	CO	HC (ppm)	NOx (ppm)
1	0,01%	19	2,05
2	0,01%	16	5,36
3	0,01%	15	10,19
4	0,02%	19	14,76
5	0,03%	43	9,71
6	0,05%	21	7,46
7	0,01%	27	2,29
8	0,00%	17	7,57
9	0,00%	17	6,91
10	0,00%	11	6,07
11	0,01%	9	4,71
12	0,01%	10	4,33
13	0,01%	10	2,07
Média	0,02%	20	6,80

Como os valores medidos de CO ficaram próximos da resolução do aparelho (0,01%) em várias medições, descartaram-se as medidas realizadas.

### Medições de emissões utilizando biodiesel etílico de soja como combustível

Na Tabela 15.5, apresentam-se os valores médios de emissões obtidas com biodiesel etílico de soja.

Tabela 15.5 – Medição de emissões de poluentes no motor quando movido a biodiesel etílico de soja

Ponto	CO	HC (ppm)	NOx (ppm)
1	0,00%	1	1,29
2	0,00%	0	5,27
3	0,00%	4	11,06
4	0,01%	6	17,66
5	0,02%	1	11,97
6	0,01%	1	7,32

*Continua*

Tabela 15.5 – Continuação

Ponto	CO	HC (ppm)	NOx (ppm)
7	0,00%	5	1,61
8	0,00%	1	7,94
9	0,00%	4	7,48
10	0,00%	7	6,40
11	0,00%	3	5,53
12	0,01%	7	4,41
13	0,00%	2	0,94
Média	0,01%	2	7,10

Como os valores medidos de CO ficaram próximos da resolução do aparelho (0,01%) em várias medições, descartaram-se as medidas realizadas.

#### Medições de emissões utilizando biodiesel etílico de soja como combustível e injeção suplementar de etanol hidratado

Efetuiu-se a medição de emissões na injeção de etanol hidratado em conjunto com o biodiesel etílico de soja. Os resultados estão na Tabela 15.6.

Como os valores medidos de CO ficaram próximos da resolução do aparelho (0,01%) em várias medições, descartaram-se as medidas realizadas.

Tabela 15.6 – Medição de emissões de poluentes no motor quando movido a biodiesel de soja, com injeção suplementar de etanol hidratado

Ponto	CO	HC (ppm)	NOx (ppm)
1	0,00%	16	0,88
2	0,05%	63	4,49
3	0,03%	29	9,78
4	0,03%	27	16,10
5	0,03%	14	10,24
6	0,03%	7	6,97
7	0,01%	24	1,43
8	0,05%	34	7,18
9	0,06%	41	6,24
10	0,06%	53	5,31
11	0,00%	5	5,64
12	0,01%	4	4,66
13	0,00%	3	1,28
Média	0,03%	21	6,45

### Comparação das medições realizadas de emissões

Na Tabela 15.7, apresenta-se a comparação das emissões de HC e NO<sub>x</sub> entre os ensaios utilizando-se diesel e biodiesel. Houve redução de emissão de HC e aumento na emissão de NO<sub>x</sub> quando se utilizou o biodiesel etílico de soja como combustível, em comparação com o diesel. Leal (2007), efetuando substituição total de diesel por biodiesel de soja, em um motor gerenciado eletronicamente, marca Mercedes Benz, modelo OM-904 LA, ciclo diesel de injeção direta, obteve redução de cerca de 32% nas emissões de CO; 18% nas emissões de HC; e aumento de cerca de 23% nas emissões de NO<sub>x</sub>. Os resultados foram diferentes, pois as condições de medições também foram diferentes, incluindo as normas de medições adotadas. Os combustíveis usados também foram diferentes (biodiesel metílico de soja x biodiesel etílico de soja).

Tabela 15.7 – Comparação de emissões utilizando-se como combustível diesel e depois biodiesel etílico de soja

Combustível	HC (ppm)	NO <sub>x</sub> (ppm)
Diesel	20	6,80
Biodiesel	2	7,10
Diferença (%)	90,00%	-4,41%

Na Tabela 15.8, apresentam-se as emissões medidas utilizando-se diesel e depois etanol hidratado em conjunto com biodiesel etílico de soja como combustível.

Houve aumento na emissão de HC, com diminuição na emissão de NO<sub>x</sub>, quando se utilizou o etanol hidratado em conjunto com biodiesel de soja como combustível, em comparação com o diesel.

Tabela 15.8 – Comparação de emissões utilizando-se como combustível diesel e depois biodiesel etílico de soja

Combustível	HC (ppm)	NO <sub>x</sub> (ppm)
Diesel	20	6,80
Biodiesel e álcool	21	6,45
Diferença (%)	-5,00%	5,15%

Chen et al. (1981), Broukhiyan e Lestz (1981) e Odaka (1992) obtiveram redução na emissão de NOx quando injetaram álcool juntamente com diesel em motor de ignição por compressão. Heisey e Lestz (1981) e Odaka (1992) obtiveram redução na emissão de NOx e aumento na emissão de CO na injeção de etanol em motor do ciclo diesel. Odaka (1992) observou aumento na emissão de HC.

Os autores, com exceção de Odaka, que não explica os motivos, atribuem a diminuição de NOx à queda na temperatura de combustão.

Heisey e Lestz (1981) atribuem o aumento na emissão de CO ao alto calor latente de vaporização do álcool e a uma possível diminuição na temperatura na câmara de combustão. Odaka (1992) não explica o motivo da alteração.

### Medição de opacidade

Os resultados de opacidade da fumaça estão apresentados na Tabela 15.9, na qual se encontram as leituras médias de cada tratamento e as médias das quatro últimas medidas, conforme metodologia proposta. Para verificar a influência da injeção de álcool na opacidade, realizaram-se os testes com diesel, injetando-se a quantidade que seria introduzida no biodiesel.

De acordo com a Tabela 15.9, quando se injetou álcool no diesel, a opacidade da fumaça reduziu 17,4% em virtude da maior eficiência da combustão, confirmando a afirmação de Lestz (1984). Para os tratamentos biodiesel e biodiesel com injeção de álcool, a opacidade teve redução a ponto de as medidas serem menores do que o limite de sensibilidade do equipamento. Estes últimos resultados estão de acordo com os encontrados por Lopes (2006).

Tabela 15.9 – Opacidade da fumaça – diesel e diesel com injeção de álcool

Leitura	Rotação (rpm)		Opacidade		
	Lenta	Corte	Diesel	Diesel injeção de álcool	Limite
1	800	2.500	0,40	0,36	2,00
2	800	2.500	0,39	0,33	2,00
3	800	2.500	0,41	0,38	2,00
4	800	2.500	0,45	0,35	2,00
5	800	2.500	0,43	0,37	2,00
6	800	2.500	0,44	0,38	2,00
7	800	2.500	0,50	0,41	2,00
Média geral			0,46 (m <sup>-1</sup> )	0,38 (m <sup>-1</sup> )	2,00 (m <sup>-1</sup> )

## Utilização de biodiesel de amendoim em trator agrícola

Os ensaios de desempenho foram realizados no Laboratório de Máquinas e Mecanização Agrícola do Departamento de Engenharia Rural da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *campus* de Jaboticabal (SP). Utilizou-se um trator marca Valtra, modelo BM100, 4x2 com tração auxiliar (TDA), potência de 73,6 kW (100 cv) no motor a 2.300 rpm (ISO 1585). Nesse ensaio, o referido trator foi instrumentado com medidor de combustível (conforme descrito por Lopes, 2006), célula de carga para medição de força na barra, radar para medir velocidade de deslocamento e sensor de rotação de patinagem das rodas. Utilizaram-se dois tipos de biodiesel de amendoim etílico, um filtrado e outro destilado.



Figura 15.6 – Vista geral do trator de ensaio com instrumentação completa.

Fonte: Lopes, 2006

## Principais resultados do biodiesel de amendoim

Os resultados estão apresentados na forma de tabelas, figuras e equações, seguindo a ordem de modelagem da densidade do combustível em razão da temperatura, do consumo de combustível e da opacidade da fumaça.

### Densidade do biodiesel de amendoim

Os resultados deste ensaio permitem determinar a variação da densidade do biodiesel em razão da temperatura e da proporção de mistura (biodiesel e diesel), e com isso possibilitar a obtenção do consumo específico de combustível, ou seja, unidade de massa por unidade de potência aproveitada na barra de tração do trator. O modelo de ajuste selecionado para as densidades foi o de maior grau, cujo teste F da análise de variância foi significativo para explicar as diferenças da densidade no fator proporção para cada tipo de biodiesel.

Tabela 15.10 – Densidade do biodiesel étílico filtrado de amendoim variando em razão da temperatura (T de 10 a 70°C) e proporção de mistura com diesel ( $B_0$  a  $B_{100}$ )

T°C	$B_0$	$B_5$	$B_{15}$	$B_{25}$	$B_{50}$	$B_{75}$	$B_{100}$
10	840	842	846	850	860	870	880
15	838	840	843	848	857	867	876
20	837	837	839	845	853	865	875
25	832	832	833	840	846	858	871
30	827	827	829	835	843	853	864
35	824	824	828	832	841	850	861
40	822	822	825	830	838	848	858
45	819	817	820	828	837	845	854
50	816	814	817	825	833	838	851
55	811	811	813	824	830	837	848
60	808	810	812	820	827	833	846
65	806	807	809	817	825	832	843
70	805	803	806	814	824	830	838



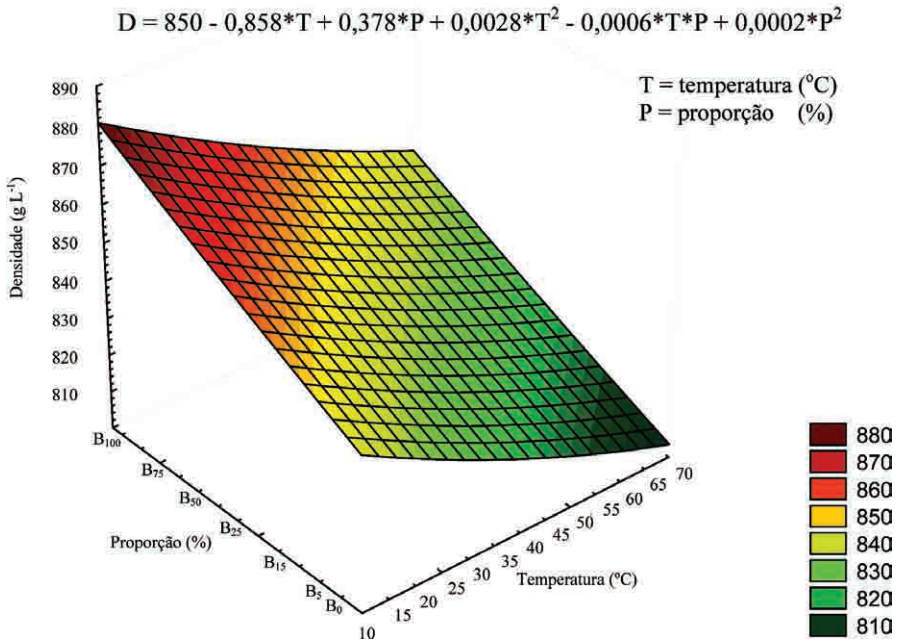


Gráfico 15.4 – Superfície de resposta de segunda ordem ajustada à densidade do biodiesel etílico filtrado de amendoim.

Tabela 15.11 – Densidade do biodiesel etílico destilado de amendoim variando em função da temperatura (T de 10 a 70°C) e proporção de mistura com diesel (B<sub>0</sub> a B<sub>100</sub>)

T°C	B <sub>0</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>15</sub>	B <sub>25</sub>	B <sub>50</sub>	B <sub>75</sub>	B <sub>100</sub>
10	840	842	845	848	855	863	870
15	838	840	841	844	852	859	867
20	837	836	838	839	850	857	863
25	832	833	833	834	845	854	860
30	827	828	830	831	840	849	855
35	824	825	826	829	838	846	851
40	822	822	823	826	837	842	848
45	819	820	820	821	830	837	845
50	816	815	817	818	827	834	841
55	811	812	814	815	824	829	838
60	808	809	812	813	822	826	835
65	806	806	809	810	819	825	832
70	805	804	804	806	814	821	829

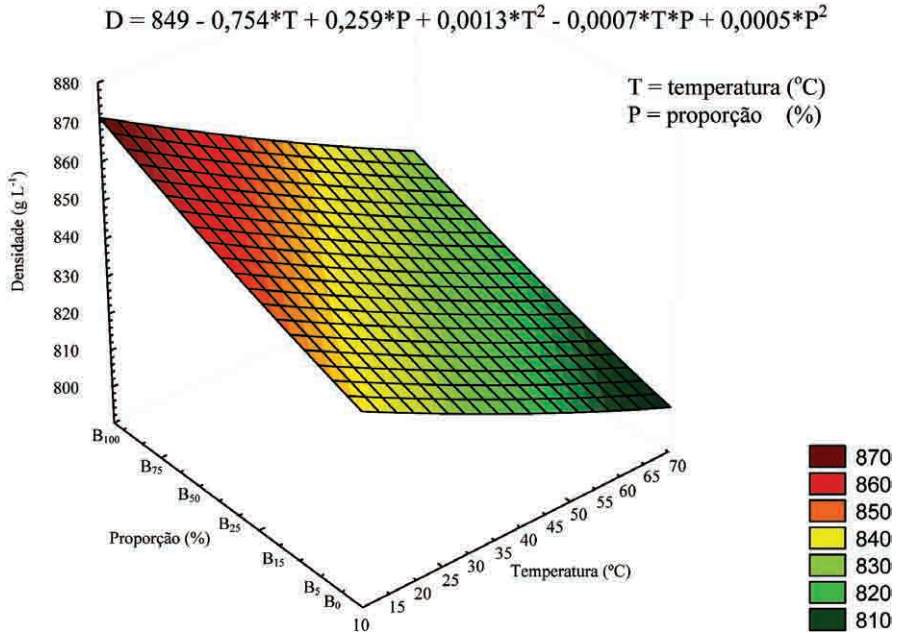


Gráfico 15.5 – Superfície de resposta de segunda ordem ajustada à densidade do biodiesel etílico destilado de amendoim.

### Patinagem

Observou-se que a patinagem média foi em torno de 12%, não sendo alterada pelos tratamentos. Tal comportamento deu-se em razão da uniformidade da força na barra de tração, bem como da regularidade da condição de superfície do solo. Ressalta-se que o tipo de biodiesel etílico de amendoim, filtrado ou destilado, não influenciou na patinagem do trator.

### Consumo de combustível do trator em razão do tipo de biodiesel

Os resultados de consumo de combustível são apresentados na forma horária volumétrica (L/h), horária ponderal (kg/h) e específica (unidade de massa de combustível por unidade de potência aproveitada na barra de tração). O primeiro é uma informação mais utilizada por agricultores; o segundo é mais utilizado por distribuidores de combustível ou aqueles preocupados com a interferência da temperatura na variação do volume; e o terceiro é a informação mais confiável para se comparar tratamentos, especialmente no meio científico.

Tabela 15.12 – Médias para as variáveis consumo horário volumétrico (Chv), consumo horário ponderal (Chp) e consumo específico (Ce) para o biodiesel etílico filtrado de amendoim

Proporção de biodiesel %	Chv L h <sup>-1</sup>	Chp kg h <sup>-1</sup>	Ce g kWh <sup>-1</sup>
B0	12,5	10,6	328
B5	12,9	10,7	336
B15	13,0	10,9	339
B25	13,3	11,2	351
B50	13,5	11,5	356
B75	13,8	11,8	365
B100	14,2	12,2	385

Tabela 15.13 – Médias para as variáveis consumo horário volumétrico (Chv), consumo horário ponderal (Chp) e consumo específico (Ce) para o biodiesel etílico destilado de amendoim

Proporção de biodiesel %	Chv L h <sup>-1</sup>	Chp kg h <sup>-1</sup>	Ce g kWh <sup>-1</sup>
B0	12,5	10,6	328
B5	12,8	10,7	333
B15	13,0	10,9	341
B25	13,3	11,2	349
B50	14,0	11,8	371
B75	14,2	12,0	382
B100	14,6	12,4	390

Analisando as Tabelas 15.12 e 15.13, verifica-se que não houve diferença entre o biodiesel filtrado e destilado, porém todas as modalidades do consumo aumentaram de B0 para B100. Nessa avaliação, foi selecionado para discussão mais acurada o consumo específico de combustível por se tratar da variável mais importante do desempenho do trator, pois abrange o consumo horário, a densidade do combustível, a velocidade do trator e a força média na barra de tração. A síntese da análise estatística do consumo específico está apresentada na Tabela 15.14.

De acordo com a Tabela 15.14, não houve interação significativa entre os fatores tipo de biodiesel (filtrado e destilado) e proporção. Quando se

comparou o biodiesel etílico filtrado com o destilado, não houve diferença significativa, ou seja, o trator consumiu a mesma quantidade com os dois tipos de biodiesel, sendo esse fato relacionado à qualidade do biocombustível utilizado nos ensaios. Entretanto, quando se comparou o consumo nas proporções, foi semelhante em  $B_0$ ,  $B_5$ ,  $B_{15}$  e  $B_{25}$ . Diante disso, pode-se recomendar a adição de biodiesel de amendoim até o limite de 25% sem se preocupar com a alteração de consumo do trator. Observaram-se, também, semelhanças de  $B_{15}$  a  $B_{50}$  e de  $B_{50}$  a  $B_{100}$ . Tal comportamento mostrou que o trator abastecido somente com biodiesel etílico de amendoim ( $B_{100}$ ) teve o consumo aumentado, em média, 18% quando comparado ao diesel ( $B_0$ ). O comportamento desse consumo encontra-se ilustrado no Gráfico 15.6.

Tabela 15.14 – Síntese da análise de variância e do teste de médias para o consumo específico de combustível referente ao biodiesel de amendoim

Fatores	Consumo específico
	g kWh <sup>-1</sup>
TIPO DE BIODIESEL (TB)	
Amendoim etílico filtrado	351 a
Amendoim etílico destilado	356 a
PROPORÇÃO ( $B_n$ )	
$B_0$	328 a
$B_5$	335 a
$B_{15}$	340 ab
$B_{25}$	350 abc
$B_{50}$	364 bcd
$B_{75}$	373 cd
$B_{100}$	387 d
TESTE F	
TB	1,24 NS
$B_n$	14,17 **
TBx $B_n$	0,57 NS
C.V.%	4,00

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; NS: não significativo ( $P > 0,05$ ); \*\*: significativo ( $P < 0,01$ ); C.V.: coeficiente de variação.

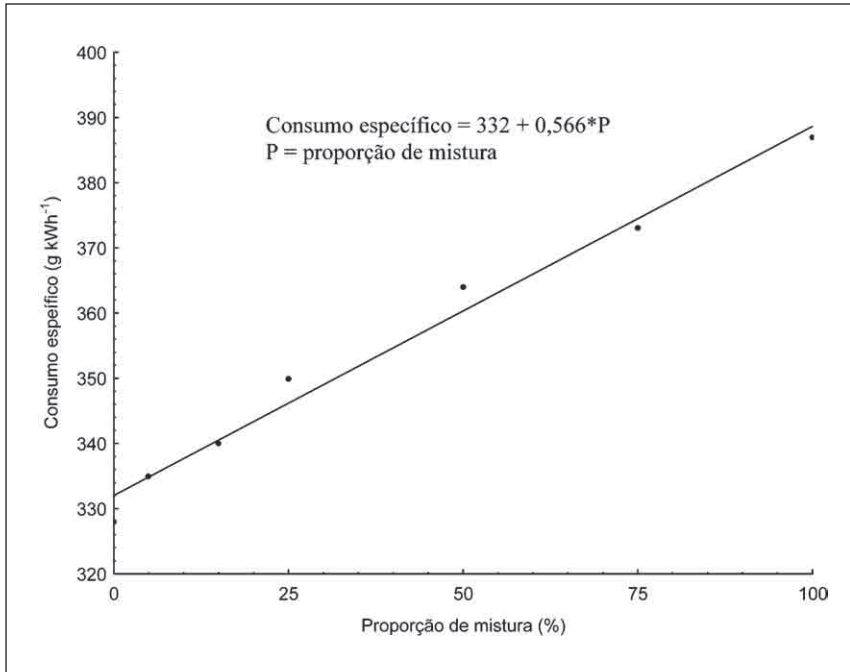


Gráfico 15.6 – Representação gráfica do consumo específico de combustível para o biodiesel de amendoim.

### Opacidade da fumaça do trator utilizando biodiesel de amendoim

Os ensaios de opacidade da fumaça foram realizados, em condição estática, no Laboratório de Máquinas e Mecanização Agrícola do Departamento de Engenharia Rural da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *campus* de Jaboticabal (SP). Utilizou-se um trator marca Valtra, modelo BM100, 4x2 com tração auxiliar (TDA), potência de 73,6 kW (100 cv) no motor a 2.300 rpm (ISO 1585). Nesse ensaio, o referido trator foi instrumentado com opacímetro TM133 para medir opacidade, tacômetro universal TM525/2 para aferir a rotação do motor, sonda coletora de fumaça e controlador serial TM616 que serve como interface entre sensores e trator. No referido ensaio utilizaram-se dois tipos de biodiesel de amendoim etílico, um filtrado e outro destilado. A ilustração do trator instrumentado para o ensaio de opacidade encontra-se na Figura 15.7.



Figura 15.7 – Vista geral do trator instrumentado para o ensaio de opacidade da fumaça.

Tabela 15.15 – Síntese da análise de variância e do teste de médias para a opacidade da fumaça do trator utilizando biodiesel de amendoim

TIPO DE BIODIESEL (TB)	OPACIDADE ( $m^{-1}$ )
Amendoim etílico filtrado	1,23 a
Amendoim etílico destilado	1,22 a
PROPORÇÃO ( $B_n$ )	
$B_0$	1,50 a
$B_5$	1,43 b
$B_{15}$	1,33 c
$B_{25}$	0,97 d
$B_{50}$	0,89 e
$B_{75}$	0,83 f
$B_{100}$	0,76 g
TESTE F	
TB	26,5 **
$B_n$	697,5 **
TBx $B_n$	0,81 NS
C.V.%	2,42

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade; NS: não significativo ( $P > 0,05$ ); \*: significativo ( $P < 0,05$ ); \*\*: significativo ( $P < 0,01$ ); C.V.: coeficiente de variação.

De acordo com a Tabela 15.15, não ocorreu interação entre os fatores tipo de biodiesel e proporção para a opacidade da fumaça. Comparando o biodiesel de amendoim etílico, não houve diferença entre o filtrado e o destilado. Analisando-se essa variável no fator proporção, observaram-se diferenças significativas em B<sub>0</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>15</sub>, B<sub>25</sub>, B<sub>50</sub>, B<sub>75</sub> e B<sub>100</sub>, evidenciando-se redução da opacidade à medida que aumentou a quantidade de biodiesel, destacando-se que a redução média foi 49% de B<sub>0</sub> para B<sub>100</sub>, sendo tal característica grande atrativo para o uso do biodiesel. Pressupõe-se que esse fato esteja relacionado com a maior eficiência da combustão do biodiesel em relação ao diesel de petróleo. O comportamento da opacidade da fumaça, de acordo com a proporção, é ilustrado no Gráfico 15.7.

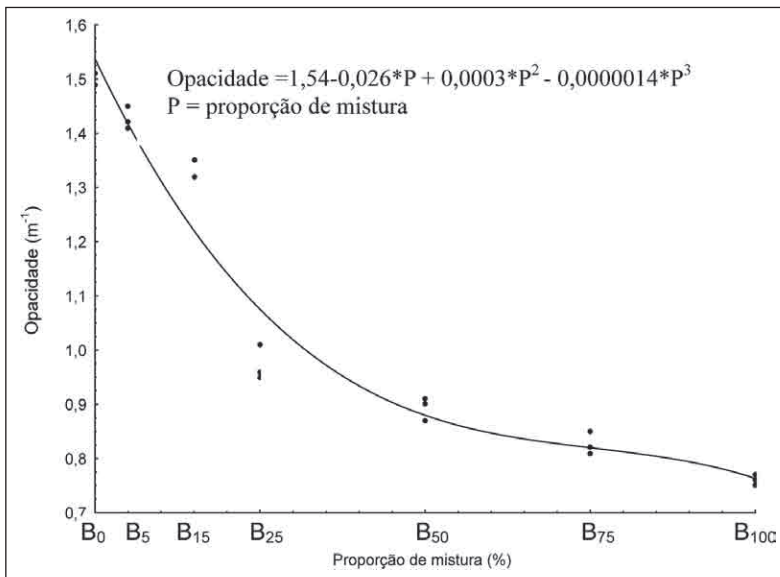


Gráfico 15.7 – Representação gráfica da opacidade da fumaça em razão da proporção de mistura biodiesel.

## Referências bibliográficas

- AGRIANUAL 2006. *Anuário da agricultura brasileira*. São Paulo: FNP, 2006. 521p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 14489: Motor diesel – Análise e determinação dos gases e do material particulado emitidos por motores do ciclo diesel – Ciclo de 13 pontos*. Rio de Janeiro: ABNT, 2000.

- BROUKHIYAN, E. M. H.; LESTZ, S. S. *Ethanol fumigation of a light duty automotive diesel engine*. Paper SAE 811209. Pennsylvania, 1981. p.15-25.
- CENTURION, M. A. P. C.; CENTURION, J. F. *Cultura do amendoim*. Jaboticabal: Unesp, 1998. 23p. (Apostila)
- CHEN, J. et al. *Ethanol fumigation of a turbocharged diesel engine*. Paper SAE 810680. Peoria, Illinois, 1981. 14p.
- DABDOUD, M. J. *Biodiesel e geração de emprego no Brasil*. 2004. Disponível em: <[www.dabdoub-labs.com.br](http://www.dabdoub-labs.com.br)>. Acesso em: 24 ago. 2004.
- EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. *Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil – 1999-2000*. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 226p. (Embrapa Soja – Documentos, 132; Embrapa Agropecuária Oeste, 5).
- \_\_\_\_\_. *Tecnologias de produção de soja – Paraná – 2004*. Londrina: Embrapa Soja, 2003. 218 p. (Sistemas de Produção/Embrapa Soja, n.3)
- GLOBO RURAL. *Embarques sustentam preços do amendoim*. Disponível em: <<http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC799493-1935,00.html>>. Acesso em: 23 ago. 2004.
- GODOY, I. J. *Prevenção da aflatoxina no amendoim*. Campinas: IAC, 2001. p.5-13.
- GOMES, P. A *soja*. 5.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 149p.
- HEISEY, J. B.; LESTZ, S. S. *Aqueous Alcohol Fumigation of a Single-Cylinder DI Diesel Engine*. Paper ASAE 811208. Pennsylvania, 1981.14p.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Geociência: área territorial oficial*. 2006. Disponível em: <[www.bge.org.br](http://www.bge.org.br)>. Acesso em: 19 jan. 2006.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 1585: Código de ensaio de motores*. s. l., 1992.
- JOSEPH JUNIOR, H. *Vehicular application of ethanol fuel – Volkswagen do Brasil*. In: *ISSCT Co-Products Workshop Ethanol Production and Use*. Piracicaba, 2003.
- KOIKE, G. H. A. *Sistema de controle digital para fornecer etanol como combustível complementar em motores 4 tempos de ignição por compressão funcionando com biodiesel*. 2008. 160f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2008.
- LEAL, G. *Tecnologia de motores Mercedes-Benz para uso de biodiesel*. Disponível em: <[http://www.transportes.rj.gov.br/downloads/Biodiesel%20B5\\_Rio%20de%20Janeiro\\_Gilberto%20Leal.pdf](http://www.transportes.rj.gov.br/downloads/Biodiesel%20B5_Rio%20de%20Janeiro_Gilberto%20Leal.pdf)>. Acesso em: 9 ago. 2007.
- LESTZ, S. S. *Utilization of alternative fuels in diesel engines*. Pennsylvania: The Pennsylvania State University, 1984. 69p.
- LOPES, A. *Biodiesel em trator agrícola: desempenho e opacidade*. 2006. 157f. Tese (Livre-docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal, 2006.
- LOPES, A. et al. *Biodiesel etílico de óleo residual: consumo de combustível de um trator agrícola em função do percentual de mistura biodiesel e diesel de petróleo*.



- In: CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA MECÂNICA, 3., 2004, Belém. *Anais...* Belém: Associação Brasileira de Engenharia Mecânica, 2004a. 1 CD-ROM.
- LOPES, A. et al. Potencialidades do biodiesel no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS VEGETAIS E BIODIESEL, 1., 2004, Varginha. *Anais...* Varginha: UFLA, 2004b. 1 CD-ROM.
- MACEDO, I. de C. *A energia da cana-de-açúcar: doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade*. São Paulo: Berlendis Editores Ltda., 2005. 245p.
- MARTIN, P. S. *Amendoim: uma planta da história no futuro brasileiro*. 2.ed. São Paulo: Ícone, 1987. 68p.
- MARTINS, J. *Motores de combustão interna*. Porto: Publindústria, Edições Técnicas, 2006. 437p.
- MOSSMANN, A. *Efeito estufa*. Disponível em: <<http://www.alexmossmann.com>>. Acesso em: 17 ago. 2003.
- NBB. NATIONAL BIODIESEL BOARD. Disponível em: <[www.biodiesel.org](http://www.biodiesel.org)>. Acesso em: 18 nov. 2002.
- ODAKA, M. et al. *Optimizing control of NOx and smoke emissions from DI engine with EGR and methanol fumigation*. Paper SAE 920486. Detroit, Michigan, 1992. p.121-9.
- PARENTE, E. J. S. *Biodiesel: uma aventura tecnológica em um país engraçado*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2003. 65p.
- PEREIRA, A. S. *O Brasil e o protocolo de Quioto*. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/clima/clima12.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2003.
- SANTOS, R. F. E. et al. Análise de detonação, torque e potência em um motor de ignição por compressão turboalimentado por um sistema ternário de combustíveis – diesel, biodiesel e etanol. In: CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA MECÂNICA, 3., 2004, Belém. *Anais...* Belém: Associação Brasileira de Engenharia Mecânica, 2004a. 1 CD-ROM.
- SÃO PAULO (Estado). Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Câmara Setorial de Biocombustíveis do Estado de São Paulo. Resolução RAA-13, de 30 de junho de 2004. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, São Paulo, v.114, n.122, seção I, 2004.
- TANIMOTO, O. S. *Plantio direto de soja sobre palhada de cana-de-açúcar*. Campinas: Cati, 2002. 18p. (Impresso Especial)

## 16

# Efeitos da utilização do biodiesel em motores de combustão interna

*Aparecido C. Gonçalves,  
Maria da Consolação Fonseca de Albuquerque,  
Rogério Katsume Kimura<sup>1</sup>*

## Introdução

Com a notoriedade que o biodiesel vem ganhando nos últimos anos, vêm se abrindo linhas de pesquisas antes não existentes. As consequências e efeitos da utilização do biodiesel são mais importantes que a sua própria fabricação. A possível contaminação dos lubrificantes com o biodiesel, por exemplo, ainda merece estudos no tocante à modificação do poder de lubrificação ou alteração das propriedades do óleo utilizado.

Neste capítulo é feita uma rápida revisão sobre biodiesel, lubrificantes e técnicas de análise de óleo lubrificante empregadas nos ensaios de motores. O capítulo é ilustrado com resultados obtidos pelo Grupo de Tribologia do Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (DEM-Feis).

Tais ilustrações são segmentos de um estudo que consistiu na utilização de três motores idênticos, com ignição por compressão, da marca Toyama.

---

<sup>1</sup> Os autores agradecem ao CNPq, à Finep, à Fapesp e à Fundunesp o contínuo apoio aos projetos de pesquisas, bolsas de estudos e auxílio para participação em congressos aprovados. Sem esses financiamentos as pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Análise de Partículas em Óleos Lubrificantes (Lapo) do Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Engenharia *campus* Ilha Solteira (Feis) não existiriam.

No primeiro banco de ensaios (motor M1), utilizou-se biodiesel de origem animal; no segundo (motor M2) utilizou-se o diesel comercial B3; e no terceiro (motor M3) utilizou-se uma mistura de biodiesel com 90% de origem vegetal acrescido de 10% de origem animal.

Todos os motores funcionaram durante um período de 20 horas antes de se executar os ensaios. Esse período foi estabelecido segundo o fabricante dos motores como sendo o período de amaciamento.

Para cada banco de ensaios (motor) foram realizados cinco ensaios. Um ensaio no amaciamento, um ensaio sem contaminação do lubrificante, e três ensaios com contaminação líquida com o próprio combustível (1%, 2% e 3 % em volume do cárter do motor).

## O biodiesel

### Histórico

Em 1900, Rudolph Diesel apresentou um protótipo de motor na Exposição Universal de Paris, o qual foi acionado com óleo de amendoim, cultura que era muito difundida nas colônias francesas na África.

Na década de 1930, a patente Belga 422.877, concedida ao pesquisador G. Chavanne da Universidade de Bruxelas, apresentou o primeiro relato do que atualmente é conhecido como biodiesel. Na patente, o uso de ésteres etílicos de óleo de palma foi obtido a partir do processo de transesterificação por meio ácido. Logo depois, em 1938, uma linha de ônibus entre Bruxelas e Louvain utilizou ésteres etílicos, obtendo resultados satisfatórios na época (Knothe et al., 2006).

Com o surgimento da Segunda Guerra Mundial, as linhas de abastecimento de petróleo foram cortadas, causando, assim, a escassez de combustíveis fósseis. Com isso, ocasionou-se o estímulo à busca de fontes alternativas.

Durante a Segunda Guerra Mundial, o combustível de origem vegetal foi utilizado extensamente em vários países, dentre eles China, Índia e Bélgica. Porém, o desenvolvimento dos combustíveis de origem vegetal foi praticamente abandonado quando o fornecimento de petróleo foi restabelecido com o final da guerra e o preço do petróleo tornou-se novamente atrativo.

Atualmente, sabe-se que os motores a diesel podem ser adaptados para utilizar como combustível os óleos vegetais *in natura* (sistema *Elsbett*<sup>2</sup>). No entanto, o método belga de transformação dos óleos parece mais adequado para resolver o problema do transporte, já que não requer nenhuma modificação nos motores.

Em 1991, foi produzido o primeiro lote de dez toneladas de biodiesel na Alemanha, a partir de óleo de canola, sendo distribuído de forma pura, isento de mistura ou aditivos, para a rede de abastecimento de combustíveis composta por cerca de 1.700 postos.

A Alemanha estabeleceu um expressivo programa de produção de biodiesel a partir da canola, sendo, em 2007, o maior produtor e consumidor europeu de biodiesel, com capacidade de um milhão de toneladas por ano. A maior usina de biodiesel do mundo fica em Hamburgo, com capacidade para 600 milhões de litros por ano. A Alemanha conta com centenas de postos que vendem o biodiesel puro (B100), com garantia assegurada dos fabricantes de veículos. O produto é comercializado a preços competitivos se comparado ao óleo diesel, pois existe a isenção dos tributos na cadeia produtiva desse biocombustível.

A Itália vem produzindo biodiesel desde meados da década de 1990 a partir da canola e do girassol, e parte do produto é destinada para o aquecimento das residências, em que pode ser usado na proporção de até 100% (B100), e para o sistema de transportes, cuja proporção de mistura varia entre 5% e 25%. Grande parte do biodiesel produzido na Itália é consumida pelo setor de transportes públicos (cerca de 80%).

No caso da França, com a produção derivada da canola e do girassol, o uso de biodiesel vem se disseminando desde 1991. Porém, diferentemente da Alemanha, nesse país o biodiesel é utilizado somente de forma misturada ao óleo diesel derivado do petróleo, e as proporções variam muito em cada setor. Por exemplo, os ônibus que fazem o transporte urbano trafegam com uma mistura que varia entre 5% e 30%, enquanto nas refinarias de petróleo estão sendo adicionados 5% de biodiesel ao óleo diesel normal.

---

2 *Elsbett* é um motor multicomcombustível que pode usar tanto óleo diesel como óleos vegetais naturais. É conhecido no Brasil como Motor Elko, que utiliza preferencialmente óleos vegetais em seu funcionamento.

A China, segundo maior importador de petróleo do planeta, começou a utilizar biodiesel para o abastecimento de veículos em 2007, na tentativa de diminuir a dependência do combustível fóssil. Ela possui cinco unidades transesterificadoras de óleo de canola e óleo de fritura usado que produzem um volume de biodiesel superior à produção americana, mas inferior à produção europeia. O governo chinês estimula o desenvolvimento do biodiesel e pretende possuir uma capacidade de produção de dez milhões de toneladas anuais até 2020, em substituição do petróleo (Penteado et al., 2007).

Merece destaque também o papel dos Estados Unidos na área de biodiesel, uma vez que várias iniciativas estão sendo desenvolvidas por esse país no sentido de preservar o meio ambiente. Em 2002 foi promulgada a Lei n.517/2002, que criou o programa biodiesel norte-americano, cuja meta de produção foi fixada ao redor de vinte bilhões de litros ao ano. Para tanto, a proporção inicial de adição do biodiesel ao óleo diesel tradicional foi de 20%, sendo o óleo popularmente chamado de EcoDiesel B20. Essa lei prevê o uso crescente de biodiesel pelo sistema de transportes e também pela frota de automóveis particulares. Institucionalmente também foi criado o National Biodiesel Board, com a função de coordenar todas as ações e políticas nesse campo energético específico.

Na América Latina destaca-se, além do Brasil, a produção de biodiesel na Argentina, que desde 2001 vem incentivando a expansão desse produto. Por meio do Decreto n.1.396 (novembro de 2001) instituiu-se o “Plano de Competitividade do Combustível Biodiesel” com a finalidade de incentivar investimentos (externos e internos) na produção do combustível, cuja matéria-prima básica é a soja e, com menor expressão, o girassol. Nesse mesmo ano, também foram instituídas normas de controle de qualidade do produto, sobretudo em termos dos testes exigidos e das regras de comercialização do produto (Mattei, 2009).

## **O biodiesel no Brasil**

O combustível normalmente utilizado para o transporte de cargas e passageiros no Brasil é o diesel de petróleo, que era importado em elevada proporção, em razão das limitações da capacidade de refino. O aproveitamento dos óleos vegetais transesterificados como combustíveis permitiria evitar a importação de óleo diesel, fortalecendo a independência energética do país.

O meio de transporte que mais expandiu no Brasil foi o rodoviário, erroneamente privilegiado como escolha estratégica, pois do ponto de vista da eficiência energética, esse tipo de transporte não é o mais aconselhável. No entanto, os outros modos de transporte alternativos, como o ferroviário e o hidroviário, também utilizam atualmente o óleo diesel como principal combustível (Gonçalves; Padovese, 2010).

A utilização de combustíveis líquidos obtidos de vegetais cultivados foi novamente lembrada como alternativa interessante para o Brasil nas crises do petróleo de 1973 a 1974 e, especialmente, de 1979 a 1980. Várias universidades brasileiras se dedicaram a estudar a produção de combustíveis substitutivos do óleo diesel, que aproveitassem diversas matérias primas de origem vegetal (Parente, 2003).

A prioridade política, no entanto, foi concedida, naquele momento, para o desenvolvimento do programa do álcool (Proálcool), que teve seu auge em meados da década de 1980. A complexidade de montar um programa de produção, processamento e distribuição do combustível alternativo, sem o apoio oficial, determinou que a crise transcorresse sem que o programa de combustíveis alternativos para o diesel fosse implantado.

Goldemberg (1988) sinalizou para as vantagens de instalar uma indústria de combustíveis derivados dos óleos vegetais. No entanto, ele alertou para a necessidade da obtenção de bons rendimentos agrícolas, já que, de outra forma, o gasto de energia nas operações de colheita e de transporte da matéria-prima seria muito elevado.

## **Vantagens do biodiesel**

Sendo esse tipo de combustível não poluente, traz-se assim um grande benefício para o meio ambiente. A emissão de  $\text{CO}_2$ , um dos principais gases causadores do efeito estufa, é reduzida em 7% na utilização de B5, 9% na utilização de B20 e 46% no caso do uso de biodiesel puro (B100). As emissões de materiais particulados e fuligens são reduzidas em até 68% e há queda de 36% dos hidrocarbonetos não queimados. Extremamente significativa também é a redução nos gases de enxofre (causadores da chuva ácida), de 17% para o B5, 25% para o B20 e 100% para o biodiesel puro, uma vez que, diferentemente do diesel de petróleo, o biodiesel não contém enxofre (MB do Brasil, 2009).

As vantagens econômicas passam pela redução das importações de petróleo e de diesel, além disso, proporciona o incentivo a agricultura familiar nas regiões mais carentes do país.

Em 2008, o Brasil deixou de gastar com importações de óleo diesel o equivalente a US\$ 976 milhões (ANP, 2009).

## Comparativo diesel x biodiesel

O Quadro 16.1 compara as principais características entre o biodiesel e o diesel comum; vale ressaltar no biodiesel a ausência dos níveis de enxofre e a biodegradabilidade muito alta quando comparada com o diesel comum.

O ponto de fulgor do diesel é inferior ao do biodiesel, sendo assim um fator de segurança para o manuseio e armazenagem do combustível.

Quadro 16.1 – Quadro comparativo das propriedades do diesel com o biodiesel

Propriedades	Biodiesel	Diesel
Cetanagem	51-62	44-47
Lubricidade	Maior que o diesel	Baixo fator de lubricidade
Biodegradabilidade	Alta	Muito baixa
Toxicidade	Não tóxico	Altamente tóxico
Oxigênio	11 % de oxigênio livre	Muito baixo
Aromáticos	Não possui	18%-22%
Enxofre	Nenhum	0,05%
Ponto de névoa	Próximo ao do diesel	
Contaminação por derramamento	Baixo	Muito alto
Ponto de ignição	148-204°C	52°C
Compatibilidade com outros materiais	Degradação natural de polímeros butílicos	Efeito não natural em polímeros butílicos
Transferência e estocagem	Nenhum risco em nenhuma das atividades	Altamente perigoso
Valor calorífico	2 % maior que o diesel	
Suprimento	Renovável	Não renovável
Combustível alternativo	Sim	Não
Processo produtivo	Reação química	Reação química e fracionamento

Fonte: Adaptada de Dabdoub (2008).

## Lubrificantes e técnicas de análise de óleo lubrificante

### Lubrificantes

Quando ocorre um movimento relativo entre superfícies, é normalmente desejável minimizar a fricção e o desgaste. Qualquer substância interposta que reduz a fricção e desgaste é um lubrificante (Cunha, 2005).

A lubrificação pode ser feita de muitas formas diferentes, dependendo da geometria dos corpos em contato, da aspereza e textura das superfícies deslizantes, da carga, da pressão, da temperatura, das velocidades de rolamento e escorregamento, das condições ambientais, das propriedades físicas e químicas do lubrificante, da composição do material e das propriedades das camadas superficiais das peças. Duas outras funções importantes dos lubrificantes são proteção contra corrosão e auxílio à vedação (ibidem).

As funções básicas de um lubrificante em um motor consistem em:

- *Redução do atrito*: A função primária do lubrificante é formar uma película delgada entre duas superfícies móveis, reduzindo o atrito e suas consequências, que podem levar à quebra dos componentes.
- *Refrigeração*: O óleo lubrificante representa um meio de transferência de calor. Nos motores de combustão interna, o calor é transferido para o óleo através de contatos com vários componentes, e então para o sistema de arrefecimento de óleo.
- *Limpeza*: Em motores de combustão interna especialmente, uma das principais funções do lubrificante é retirar as partículas resultantes do processo de combustão e manter essas partículas em suspensão no óleo, evitando que se depositem no fundo do cárter e provoquem incrustações.
- *Proteção contra a corrosão*: A corrosão e o desgaste podem resultar na remoção de metais do motor, por isso a importância dos aditivos anticorrosivo e antidesgaste.
- *Vedação da câmara de combustão*: O lubrificante, ao mesmo tempo que lubrifica e refrigera, também age como agente de vedação, impedindo a saída de lubrificante e a entrada de contaminantes externos ao compartimento.



Dentre os vários tipos de lubrificantes será dada ênfase aos lubrificantes líquidos utilizados em motores a combustão interna de ciclo diesel.

Uma maneira de caracterizar os lubrificantes líquidos é por meio de sua viscosidade, e, no caso de lubrificantes para motores, caracterizam-se também pelo nível de aditivos utilizados para melhorar seu desempenho. Os lubrificantes são subdivididos de acordo com a sua base de formulação, ou seja, são definidos como (Petrobras, 1999):

- *Minerais*: São óleos obtidos a partir da destilação do petróleo. Suas propriedades dependem da natureza do óleo cru, cuja composição, muito variada, é formada por grande número de hidrocarbonetos, pertencentes a três classes: parafínicos, naftênicos e aromáticos. Os óleos minerais são os mais utilizados e importantes em lubrificação.
- *Graxos*: São óleos de origem vegetal ou animal. Foram os primeiros lubrificantes a serem utilizados, e satisfaziam as modestas necessidades da época em que predominava a tração animal. Atualmente são pouco recomendados, especialmente por não suportarem temperaturas elevadas, oxidando-se facilmente, tornando-se rançosos e formando ácidos.
- *Aditivados*: Os óleos aditivados são óleos minerais puros ou sintéticos, aos quais foram adicionados substâncias comumente chamadas de aditivos, com o fim de reforçar ou acrescentar determinadas propriedades.
- *Compostos*: São misturas de óleos minerais e graxos. Certas aplicações especiais requerem muitas vezes o uso de óleos compostos, que conferem ao produto obtido maior oleosidade e maior facilidade de emulsão na presença de vapor. Geralmente são utilizados em equipamentos como perfuratrizes e cilindros a vapor.
- *Sintéticos*: São lubrificantes desenvolvidos em laboratório por processo de polimerização, especialmente para oferecer características especiais de viscosidade e resistência a temperaturas elevadas ou muito baixas, de forma a atender aplicações especiais em algumas indústrias. Esses lubrificantes são de custo elevado, devendo, portanto, serem empregados apenas em casos específicos que não possam ser atendidos.

## Técnicas de análise de lubrificantes usados

### Espectrometria

Tendo em vista a gama de materiais que compõem um equipamento, a espectrometria surge com uma das técnicas que auxiliam no monitoramento das partículas presentes no lubrificante, é uma ferramenta que proporciona o melhor momento para a manutenção do equipamento (Gonçalves et al., 2007).

Os Programas de Análise de Óleo por Espectrografia (Spectrometric Oil Analysis Program – Soap) começaram a ser utilizados nos anos 1940 pela indústria da estrada de ferro para teste de desgaste a partir de amostras de lubrificante. Com o advento do espectrômetro de emissão atômica os métodos Soap passaram a ser utilizados em aviões militares e em alguns veículos militares com motores a diesel. Os métodos incluem a absorção atômica (AA), espectrografia de emissão atômica (AES), plasma induzido por emissão (ICPE), Raio X por fluorescência (XRF). Desses métodos, AES e ICPE se baseiam na detecção da luz emitida pelos elementos, são os mais populares por causa do custo, da velocidade e de outros fatores (Lockwood; Dalley, 1992).

A Figura 16.1 mostra o princípio de funcionamento de um espectrômetro.

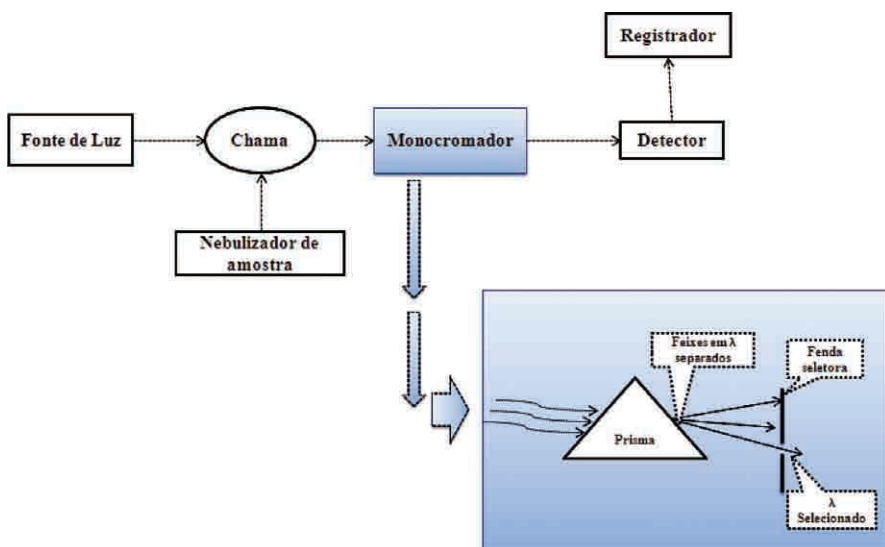


Figura 16.1 – Esquema de funcionamento de um espectrógrafo.

Fonte: Adaptado de Silva Jr. et al. (2006).

A maioria dos equipamentos modernos de espectrometria atômica é capaz de medir tanto a radiação absorvida por uma espécie atômica quanto a sua emissão. Dessa forma, é muito importante para o operador compreender os processos que ocorrem em cada uma das técnicas.

Cada elemento tem um número específico de elétrons associados com seu núcleo. A configuração mais estável de um átomo é denominada “estado fundamental” e representa a forma como esse é comumente encontrado no estado gasoso.

Se uma determinada quantidade de energia é aplicada sobre o átomo e essa é absorvida, um dos elétrons mais externos será promovido a um nível energético superior, levando o átomo a uma configuração energética menos estável denominada “estado excitado”. Uma vez que essa configuração é instável, o átomo retorna imediatamente para o “estado fundamental”, liberando a energia absorvida sob a forma de luz.

A Tabela 16.1 apresenta os valores das partículas para três motores analisados no Laboratório de Tribologia do DEM da Feis.

Tabela 16.1 – Valores da absorção atômica da amostra de lubrificante

Nível de contaminação por combustível	Motores	Cu (ppm)	Si (ppm)	Al (ppm)	Fe (ppm)	Pb (ppm)	Cr (ppm)	Ni (ppm)
Amaciamento	Motor M1 <sup>(1)</sup>	5	17	5	35	33	8	0
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	9	21	8	35	22	8	1
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	7	16	3	24	37	7	0
0% de contaminação	Motor M1 <sup>(1)</sup>	3	13	2	25	25	9	1
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	4	16	3	25	9	7	1
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	5	19	4	22	34	7	1
1% de contaminação	Motor M1 <sup>(1)</sup>	3	18	2	20	18	7	1
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	3	17	5	26	4	6	1
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	4	14	2	18	29	6	0
2% de contaminação	Motor M1 <sup>(1)</sup>	3	14	1	20	15	6	1
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	2	16	3	25	5	6	1
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	3	13	2	17	29	6	0
3% de contaminação	Motor M1 <sup>(1)</sup>	2	13	1	19	12	6	0
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	2	4	3	21	29	6	0
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	3	14	3	17	30	6	0

<sup>(1)</sup> Motor operando com biodiesel B100 de origem animal;

<sup>(2)</sup> Motor operando com diesel comercial B3;

<sup>(3)</sup> Motor operando com biodiesel B100 (90% origem vegetal, 10% animal).

Analisando a Tabela 16.1, nota-se um maior desgaste dos componentes, expresso pelos teores de Fe e Cu nas suas composições, durante o período de amaciamento em relação aos demais períodos ensaiados.

## Ferrografia

O termo ferrografia foi introduzido na década de 1970 pelos inventores Seiffert e Westcott, que necessitavam na época de uma melhoria da análise de óleo lubrificante dos motores aeronavais. Até então, usava-se o método usual de quantificar a concentração de material particulado, no qual as partículas eram depositadas em filtro de papel e observadas em microscópio. Assim, tornava-se difícil observar a morfologia e as dimensões das partículas (Gonçalves; Campos-Silva, 2011).

A ferrografia é uma técnica de monitoramento e diagnose que auxilia na determinação da severidade, nos modos e tipos de desgastes em máquinas, que influenciam na tomada de decisões quanto ao tipo e a urgência de intervenção da manutenção.

Essa técnica baseia-se em algumas premissas, as quais podem ser destacadas:

- Toda máquina desgasta-se antes de falhar;
- O desgaste gera partículas;
- A quantidade e o tamanho das partículas são diretamente proporcionais à severidade do desgaste que pode ser constatado mesmo a olho nu;
- Os componentes de máquinas que sofrem atrito geralmente são lubrificados e as partículas permanecem em suspensão durante certo tempo;
- Considerando que as máquinas e seus elementos são constituídos basicamente de ligas de ferro, a maior parte das partículas provém dessas ligas.

A Figura 16.2 demonstra o esquema de um ferrógrafo, equipamento desenvolvido na época por Westcott que separava as partículas presentes no óleo de acordo com o seu tamanho.

Existem dois tipos de análise ferrográfica: uma quantitativa que consiste em avaliar as condições de desgaste dos componentes de uma máquina ou equipamento por meio da quantificação das partículas em suspensão no

óleo, e outra do tipo analítica, que observa a morfologia das partículas no lubrificante.

A Figura 16.4 ilustra um exemplo de ferrografia utilizada em um motor operando com biodiesel B100 que operou sem carga acoplada.

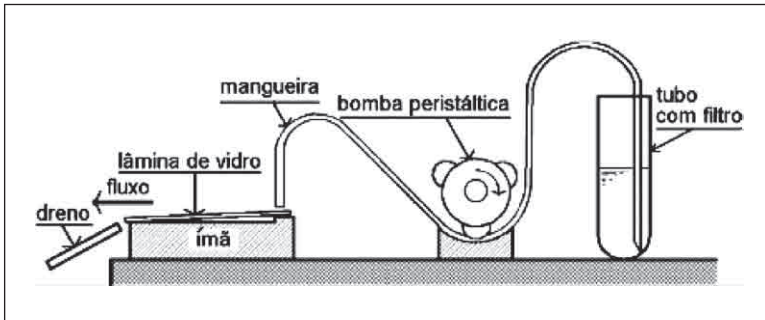


Figura 16.2 – Esquema de ferrógrafo.

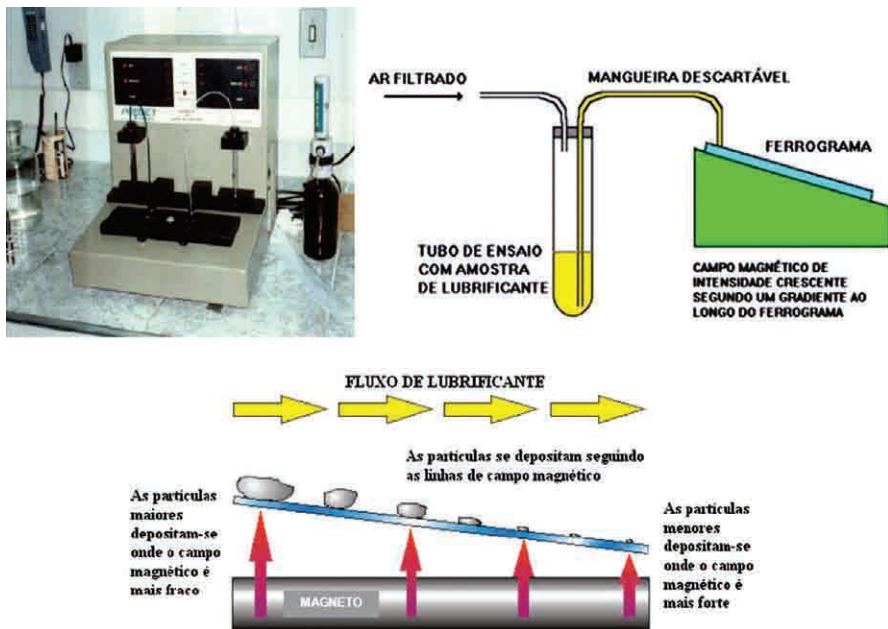


Figura 16.3 – Ferrógrafo analítico FM III, juntamente com seu princípio de funcionamento. Fonte: Adaptado de Lago (2007).

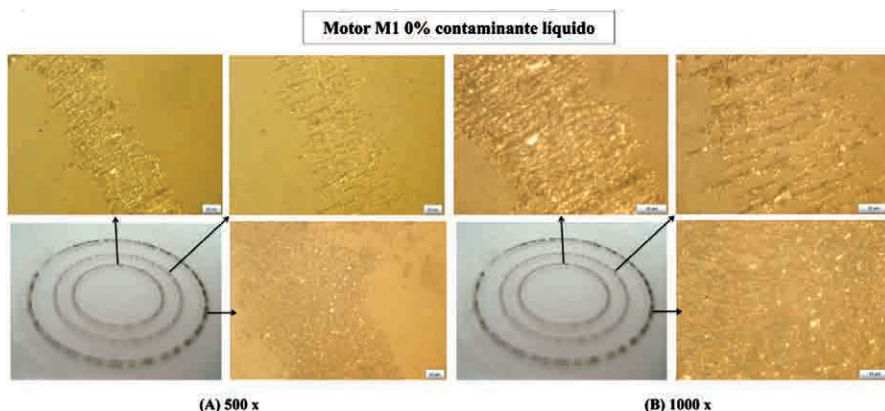


Figura 16.4 – Imagens dos ferrogramas das amostras sem contaminantes líquidos do motor M1 (B100 Animal) obtidas via microscópio com aumento de 500x e 1000x.

As imagens da Figura 16.4 não apresentaram indício de desgaste anormal ou severo. Todas as lâminas fotografadas apresentaram desgastes conhecidos como benigno, isto é, desgaste natural dos componentes.

## Viscosidade

É a propriedade mais importante dos óleos lubrificantes, podendo ser definida como a tensão de cisalhamento em um plano no fluido por unidade de gradiente de velocidade normal ao plano. A viscosidade pode ser expressa em termos de viscosidade cinemática ( $\text{mm}^2/\text{s}$  ou cSt) ou viscosidade absoluta ou dinâmica (Pa.s).

Sir George Gabriel Stokes (1819-1903) foi um matemático e físico irlandês, que fez importantes descobertas para a mecânica dos fluidos, física, matemática e óptica. Ele encontrou uma expressão para a força friccional em objetos esféricos com pequenos números de Reynolds. Seu trabalho em movimentos de fluidos e viscosidade resultou no cálculo da velocidade terminal de uma esfera caindo em um meio viscoso, o que ficou conhecido como Lei de Stokes. Mais tarde, a unidade de viscosidade foi denominada Stokes em homenagem ao seu trabalho.

Hutchings (1992) define a viscosidade de fluidos newtonianos, em termos da deformação por cisalhamento  $\dot{\gamma}$ , conforme representado na Equação (16.1).

$$\tau = \eta \cdot \frac{\partial \gamma}{\partial t} \quad (16.1)$$

onde:

$\tau$  = tensão de cisalhamento (Pa);

$\eta$  = viscosidade dinâmica (Pa.s);

$\frac{\partial \gamma}{\partial t}$  = taxa de deformação por cisalhamento.

A viscosidade cinemática é definida conforme Equação (16.2).

$$Z = \frac{\eta}{\rho} \quad (16.2)$$

onde:

$Z$  = viscosidade em cSt ou mm<sup>2</sup>/s;

$\rho$  = massa específica.

Os resultados apresentados na Tabela 16.2, para três motores, foram obtidos seguindo a norma ASTM D445, utilizando-se portanto um viscosímetro cinemático de numero 350.

Tabela 16.2 – Viscosidades dos ensaios realizados

Nível de contaminação por combustível	Motores	Viscosidade cinemática a 40°C (cSt)	Viscosidade cinemática a 100°C (cSt)
0% de contaminação	Motor M1 <sup>(1)</sup>	147,98	14,50
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	147,07	15,32
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	140,09	14,46
3% de contaminação	Motor M1 <sup>(1)</sup>	115,90	13,40
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	135,99	14,56
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	107,18	12,75

<sup>(1)</sup> Motor operando com biodiesel B100 de origem animal;

<sup>(2)</sup> Motor operando com diesel comercial B3;

<sup>(3)</sup> Motor operando com biodiesel B100 (90% origem vegetal, 10% animal).

Se observado cada motor individualmente, verifica-se que a viscosidade a 40°C diminui com o aumento do teor de contaminação, redução essa um pouco mais acentuada com o uso de biodiesel.

## Densidade

A densidade pode ser definida como o número que determina o peso de certo volume de uma substância quando ela estiver submetida a uma determinada temperatura. Assim, se um óleo possui densidade de  $0,8 \text{ g/cm}^3$  a  $25^\circ\text{C}$ , significa que, nessa temperatura,  $1 \text{ cm}^3$  do óleo pesa  $0,8 \text{ g}$ .

O método usual para sua determinação é mergulhar no óleo um densímetro, que fica em equilíbrio a certa profundidade. Nessa haste graduada lê-se, ao nível da superfície, a valor da densidade.

## Ponto de fulgor

Caracteriza-se como sendo a menor temperatura de um óleo na qual o vapor liberado na atmosfera inflama-se momentaneamente com a aplicação de uma chama, formando assim um lampejo ou *flash*.

A determinação do ponto de fulgor mais empregada é feita seguindo a norma ASTM D92-52, por meio do aparelho Cleveland. Quando a temperatura chega próxima do ponto de fulgor previsto, usa-se uma chama esférica sob o óleo que está sendo aquecido no aparelho.

Um detalhe importante é distinguir o ponto de fulgor do ponto de combustão que é a temperatura na qual os vapores de óleo queimam de modo contínuo, durante um mínimo de 5 segundos. Normalmente o ponto de combustão é, em média  $22$  a  $28^\circ\text{C}$  acima do ponto de fulgor. Outro ponto a ser esclarecido é a diferença do ponto de fulgor e de combustão com o ponto de autoinflamação do lubrificante, que é a temperatura na qual o óleo se inflama espontaneamente, sem o contato com a chama.

O conhecimento do ponto de fulgor permite avaliar as temperaturas de serviços que um óleo lubrificante pode suportar com absoluta segurança. Óleos com ponto de fulgor inferior a  $150^\circ\text{C}$  não devem ser empregados para fins de lubrificação. Esse é um tipo de teste que avalia o nível de contaminação por combustível no óleo (Moura; Carreteiro, 1978).

A Tabela 16.3 apresenta o resultado do ensaio de ponto de fulgor nos três motores para as amostras com maiores níveis de contaminação.

Houve apenas uma ligeira diminuição do ponto de fulgor em relação ao lubrificante não contaminado em todos os motores analisados. Os valores são tão pequenos que não representam informações precisas em razão da resolução do termômetro utilizado.



Tabela 16.3 – Ponto de fulgor obtido das amostras com 3% de contaminação

Grau contaminação lubrificante	Motor	Temperatura (°C)
3%	Motor M1 <sup>(1)</sup>	214
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	210
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	208
Novo		215 (valor medido), 262 (valor de catálogo)

<sup>(1)</sup> Motor operando com biodiesel B100 de origem animal;

<sup>(2)</sup> Motor operando com diesel comercial B3;

<sup>(3)</sup> Motor operando com biodiesel B100 (90% origem vegetal, 10% animal).

## Concentração de partículas

Atualmente existem vários testadores automáticos de partículas, alguns podem relacionar a quantidade de partículas não ferrosas, partículas ferrosas ou o número de partículas totais. Por exemplo, o *Contameter* Toshiba foi concebido não só para fornecer um exame visual para o microscópio, como também pode detectar partículas pela absorção de raios infravermelhos (independentemente da coloração do lubrificante), sendo seu princípio de funcionamento mostrado na Figura 16.5.

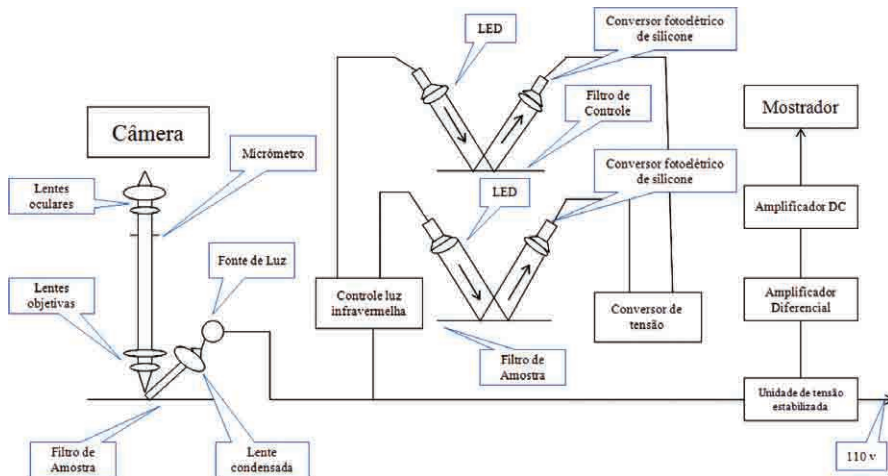


Figura 16.5 – Princípio de funcionamento equipamento *Contameter* Toshiba (Roynance; Hunt, 1999).

Outro tipo de equipamento comumente usado é o monitor automático de partículas (PQA). Ele examina a amostra por meio de um campo indutivo, que ao detectar a presença de materiais magnéticos apresenta o resultado na forma de um índice adimensional chamando índice PQ. Esse índice é diretamente relacionado com a quantidade de materiais ferromagnéticos contidos no óleo, informação muito útil na construção dos gráficos de tendências.

O tamanho de influência é de alguns microns a cerca de 1 mm, e, portanto, abrange tamanhos de partículas de desgaste normais.

Na Figura 16.6 é mostrado um monitor automático de partículas (PQA), juntamente com o seu diagrama de funcionamento.

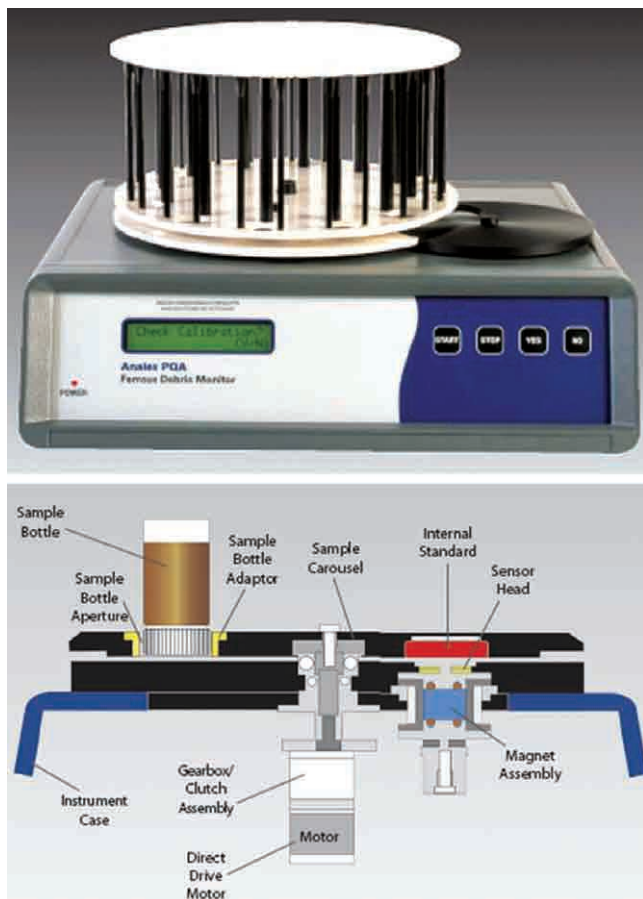


Figura 16.6 – Monitor automático de partículas e diagrama de funcionamento.

Fonte: Disponível em: <<http://www.kittiwake.com/ANALEXrpd.htm>>.

A Tabela 16.4 indica os níveis da concentração dos materiais magnéticos contidos nas amostras coletadas nos motores a cada estágio de contaminação.

Tabela 16.4 – Índice PQ das amostras dos motores

Grau de contaminação do lubrificante	Motores	Índice PQ (média)
Amaciamento	Motor M1 <sup>(1)</sup>	19
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	23
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	19
0% de contaminação	Motor M1 <sup>(1)</sup>	15
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	15
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	16
1% de contaminação	Motor M1 <sup>(1)</sup>	17
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	16
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	15
2% de contaminação	Motor M1 <sup>(1)</sup>	15
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	16
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	15
3% de contaminação	Motor M1 <sup>(1)</sup>	15
	Motor M2 <sup>(2)</sup>	17
	Motor M3 <sup>(3)</sup>	15

<sup>(1)</sup> Motor operando com biodiesel B100 de origem animal;

<sup>(2)</sup> Motor operando com diesel comercial B3;

<sup>(3)</sup> Motor operando com biodiesel B100 (90% origem vegetal, 10% animal).

Nota-se uma presença maior de partículas magnéticas no período de amaciamento. Esse comportamento é explicado pelo fato de as partes móveis ainda estarem sem o assentamento correto, e ainda por possuírem um resíduo de material do processo de usinagem.

## Filtragem por membrana

Com a operação normal do equipamento, gera-se uma variedade de contaminantes, como metais de desgaste, oxidação e outros subprodutos, que devem ser levados pelo lubrificante para assegurar o funcionamento adequado; além disso, o óleo também é exposto a contaminantes externos, tais como água, sujeira e/ou combustível. Lubrificantes e sistemas hidráulicos contêm filtros para reduzir ou eliminar e/ou reduzir os níveis de contaminação.

A limpeza do óleo é de extrema importância em todas as máquinas lubrificadas, e em particular em equipamentos de folgas ultrafinas, como o rolamento antiatrito em motores de aviões e servo-válvulas em sistemas hidráulicos. Na verdade, as partículas de desgaste, na faixa de tamanho de 2 a 10  $\mu\text{m}$ , são responsáveis por até 80% de falhas no sistema hidráulico. Conseqüentemente, a filtração de óleo é um aspecto importante de lubrificação de equipamentos e de particular interesse para o analista de petróleo.

Para avaliar o estado do óleo lubrificante, a técnica da filtragem por membrana retém os particulados através de elemento filtrante de alta precisão com *mesh* de 5  $\mu\text{m}$ , e, com a análise em microscópio, permite a visualização das partículas e a contagem comparativa dos elementos presentes na amostra.

O método padrão para quantificar a limpeza do lubrificante tem sido publicado pela ISO (International Standards Organization). A ISO estabeleceu a norma ISO 4406 para relacionar a contagem de partículas em níveis de limpeza do fluido que permite o estabelecimento de limites e alarmes para avisar quando a contaminação é excessiva. A norma ISO é representada por um sistema de dois ou três dígitos, a saber:

- *Sistemas de dois dígitos*: São utilizados para quantificar partículas em sistemas de limpeza em lubrificantes e sistemas hidráulicos usados em geral na indústria. O primeiro dígito indica a contagem de partículas acima de 5  $\mu\text{m}$ , e o segundo dígito indica a contagem de partículas superiores a 15  $\mu\text{m}$ . O nível de contaminação é indicado pelos desvios dos valores do sistema normal.
- *Sistemas de três dígitos*: O sistema foi proposto pela corporação Pall e Vickers Inc. como um meio para proteger e monitorar sistemas de servoválvulas ou sistemas hidráulicos de alto desempenho. O primeiro dígito indica a contagem de partículas acima de 2  $\mu\text{m}$ , o segundo indica o número de partículas acima de 5  $\mu\text{m}$ , e o terceiro dígito representa a contagem de partículas acima de 15  $\mu\text{m}$ .

Sucintamente, o código ISO de classificação de contagem de partículas é representado na Figura 16.7.

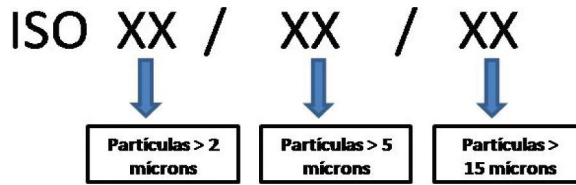


Figura 16.7 – Representação classificação ISO 4406 para contagem de partículas.

A nova ISO 11171 substituiu a ISO 4406 em aceitação da ISO MTD (Medium Test Dust) como uma substituição da ACFTD (Air Cleaner Fire Test Dust). A maioria das versões extensamente usadas dessa norma técnica refere-se ao número de partículas maiores que 4, 6, e 14  $\mu\text{m}$  em 1 mL de fluido. O número de partículas 4+ e 6+ é usado como um ponto de referência de partículas. O tamanho 14+ indica a quantidade de partículas grandes presentes, as quais contribuem grandemente para a possível falha catastrófica da máquina.

A Tabela 16.5 apresenta os valores do sistema ISO para determinação da quantidade de partículas.

Tabela 16.5 – Sistema de classificação ISO para partículas

CÓDIGO ISO	Quantidade de partículas por mL		CÓDIGO ISO	Quantidade de partículas por mL	
	Mínimo	Máximo		Mínimo	Máximo
1	0,01	0,02	15	160	320
2	0,02	0,04	16	320	640
3	0,04	0,08	17	640	1300
4	0,08	0,16	18	1300	2500
5	0,16	0,32	19	2500	5000
6	0,32	0,64	20	5000	10000
7	0,64	1,3	21	10000	20000
8	1,3	2,5	22	20000	40000
9	2,5	5	23	40000	80000
10	5	10	24	80000	160000
11	10	20	25	160000	320000
12	20	40	26	320000	640000
13	40,0	80	27	640000	1300000
14	80	160	28	1300000	25000000

Fonte: Adaptado de Malpica (2007).

A contagem de partículas é usada extensamente para monitorar os sistemas hidráulicos, onde as partículas de desgaste são maiores que 10  $\mu\text{m}$  (além dos limites da espectrografia normal). Muitas indústrias publicam níveis recomendados de contagem de partículas. A contagem de partícula é mais apropriada quando os mecanismos de fadiga são meios preliminares da falha ou quando as partículas de contaminantes causam abrasão (Lago, 2007).

Visualmente, a Figura 16.8 indica as diferenças entre as membranas de filtragem dos óleos coletados nos motores em cada nível de contaminação.

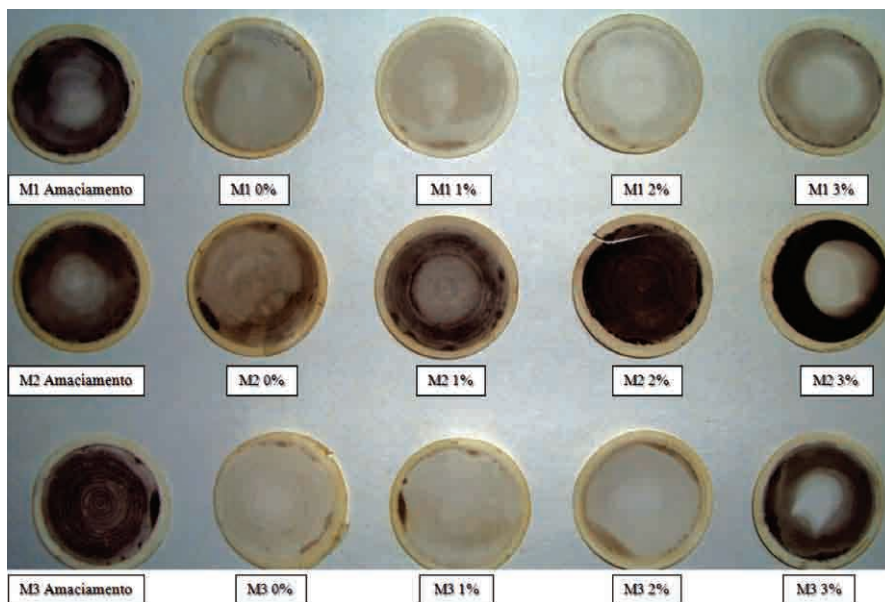


Figura 16.8 – Comparativo visual das membranas de filtragem.

Pela Figura 16.8 observa-se que a utilização do diesel comercial B3 formou maior quantidade de fuligem. Isso é mais bem caracterizado por meio das membranas localizadas horizontalmente na linha do meio da figura, isto é, motor M2.

As Figuras 16.9 e 16.10 mostram as partículas obtidas das membranas de celulose e fotografadas em microscópio com um aumento de 500 e 1.000 vezes em dois níveis de contaminação.

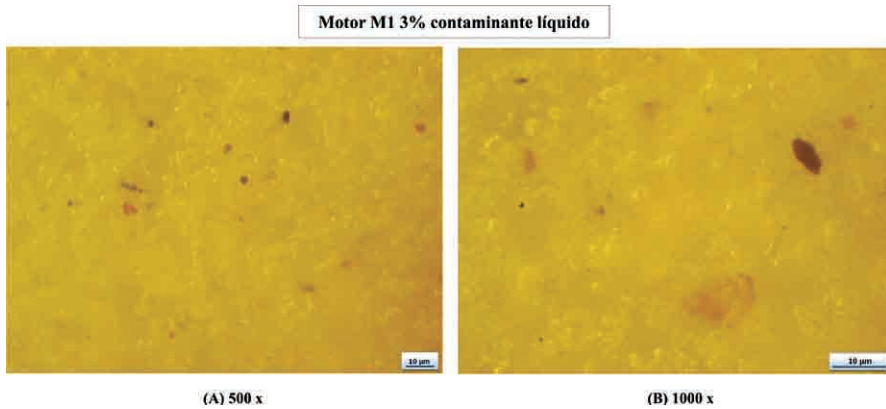


Figura 16.9 – Partículas das membranas de celulose obtidas em microscópio do motor M1, com 3% de contaminante líquido e com aumento de 500x e 1000x

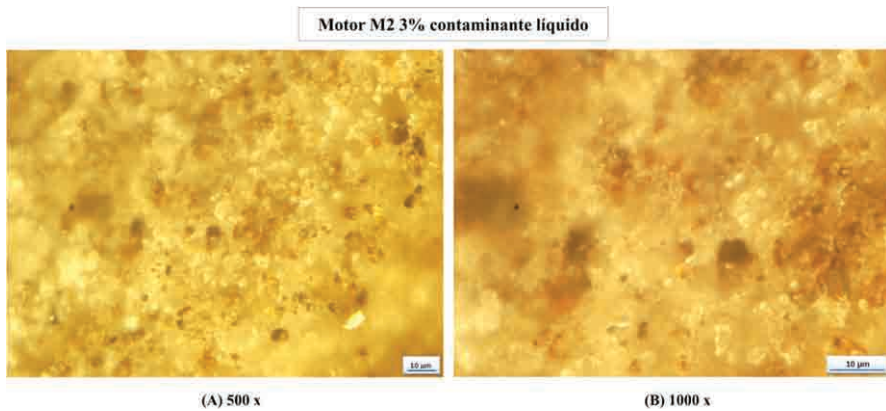


Figura 16.10 – Partículas das membranas de celulose obtidas em microscópio do motor M2, com 3% de contaminante líquido e com aumento de 500x e 1000x.

As Figuras 16.9 e 16.10 confirmam o fato apontado no comentário sobre a Figura 16.8, de que as membranas ensaiadas com os lubrificantes dos motores a diesel comercial B3 apresentaram maior quantidade de fuligem.

Segundo Van Gerpen (apud Silva, 2006), o processo de combustão cujo resultado é a produção de partículas de fuligem é um dos maiores desafios dos projetistas. Tais partículas são formadas em regiões de alta temperatura na câmara de combustão. Com o uso do biodiesel, os níveis de fuligem produzida são reduzidos, e a causa está associada à quantidade de oxigênio presente no combustível.

## Conclusões

Em relação ao ilustrado no capítulo, pode-se concluir que as imagens obtidas na ferrografia analítica indicaram que as partículas de desgaste possuem dimensões e morfologias normais para o regime de trabalho adotado. As dimensões em sua maioria não ultrapassaram 10  $\mu\text{m}$ , tamanhos esses considerados como um desgaste normal.

Os valores encontrados mediante a absorção atômica indicam a presença normal dentre os valores obtidos dos elementos. A avaliação para determinar se os níveis de partículas encontrados estão dentro da normalidade baseiam-se no monitoramento contínuo do equipamento. Uma alteração brusca nas quantidades dos elementos presentes no óleo pode indicar uma falha ou uma possível interferência externa (desalinhamento, desbalanceamento, sobrecarga) sobre o equipamento.

Em relação à viscosidade, os valores obtidos indicam que uma contaminação com o biodiesel B100 afeta o equipamento de maneira considerável, quando comparados com a contaminação com o diesel comercial. Essa alteração foi mais observada para o lubrificante do motor com os níveis de 3% de contaminação.

Os valores da viscosidade dos lubrificantes analisados também diminuíram com o teor de contaminação líquida para os lubrificantes contaminados com diesel comercial. A diminuição foi pequena, porém confirma a necessidade de se monitorar a viscosidade de um lubrificante automotivo em um programa de manutenção preditiva. Caso uma diminuição da viscosidade aconteça em um monitoramento contínuo e periódico, pode ser um indicativo de contaminação do lubrificante pelo combustível utilizado e, se em quantidades anormais, apontar para uma intervenção no motor.

Também se conclui que, se analisada apenas uma técnica de Análise de Lubrificantes em separado, pode-se incorrer em erros. Se fossem analisadas apenas as membranas celulósicas, por exemplo, seria deduzido que o motor M2 apresentou maior desgaste, pois as membranas relativas a esse motor estavam mais sujas. Observando essas membranas juntamente com os resultados PQA e valores de absorção atômica combinados, conclui-se que essas “sujeiras” não são sinônimas de desgastes, e sim de fuligem, pois os valores dos metais presentes na absorção atômica e os valores obtidos nos ensaios PQA não foram maiores, para o motor M2, considerando o mesmo nível de contaminação do lubrificante pelo combustível.



Analisando os valores obtidos via PQA, observa-se que os níveis mantiveram-se superiores nos períodos de amaciamento e com posterior decréscimo e estabilização nos demais estágios do teste para cada nível de contaminação. O lubrificante Novo foi o que apresentou o menor valor PQA.

A visualização das membranas via microscópio óptico demonstra que com o uso do diesel comercial o nível de particulados e fuligem aumentou substancialmente, comprovando assim o aumento da emissão de fuligem e emissão de carbono que se traduz em vantagens ambientais para a utilização do biodiesel.

Por fim se conclui que cada tipo de biodiesel tem um efeito nos motores de combustão interna, que a provável contaminação desse biodiesel no sistema de lubrificação altera as propriedades dos lubrificantes e, por conseguinte, o funcionamento dos motores, e que o estudo desses efeitos é de fundamental importância para validação dos biodiesel existentes.

## Referências bibliográficas

- ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Gás Natural e Biocombustíveis. *Biodiesel*. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp>>. Acesso em: 12 dez. 2009.
- CUNHA, R. C. *Análise do estado de conservação de um redutor de velocidade através da técnica de partículas de desgaste no óleo lubrificante auxiliada pela análise de vibrações*. Ilha Solteira, 2005. 164f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- DABDOUB, M. J. *O Programa paulista de produção de Biodiesel – pré-projeto de criação da rede paulista de Biodiesel*. Disponível em: <[http://dabdoublabs.com.br/Sintese\\_projeto.htm](http://dabdoublabs.com.br/Sintese_projeto.htm)>. Acesso em: 17 ago. 2008.
- GOLDEMBERG, J. *Energia para o desenvolvimento econômico*. São Paulo: T. A. Queiroz, 1988.
- GONÇALVES, A. C. et al. Vibration and wear particles analysis in a test stand. *Industrial Lubrication and Tribology*, London, v.59, p.209-16, 2007.
- GONÇALVES, A. C.; CAMPOS-SILVA, J. B. Predictive maintenance of a reductor with contaminated oil under an excentrical load through vibration and oil analysis. *Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering* (Impresso), v.XXXIII, p.1/1-7, 2011.
- GONÇALVES, A. C.; PADOVESE, L. R. Vibration and oil analysis for monitoring problems related to water contamination in rolling bearing. In: FIRST INTER-

- NATIONAL BRAZILIAN CONFERENCE ON TRIBOLOGY – TriboBR 2010, 2010, Rio de Janeiro. First International Brazilian Conference on Tribology – TriboBR 2010 and ITS - IFTo MM 2010 - 2nd International Tribology Symposium of IFToMM, 2010.
- HUTCHINGS, I. M. *Tribology: friction and wear of engineering materials*. London: Edward, 1992.
- INTERNATIONAL STANDART ORGANIZATION – ISO 4406. Hydraulic fluid power – fluids – method for coding the level of contamination by solid particles. Genève: ISO, 1999a. (ISO 4406)
- \_\_\_\_\_. ISO 11171. Hydraulic fluid power – calibration of automatic particle counters for liquids. Genève: ISO, 1999b. (ISO 11171)
- KITTIWAKE. *Manual PQA*. Disponível em: <[http://www.kittiwake.com/wear\\_debris\\_monitors.htm](http://www.kittiwake.com/wear_debris_monitors.htm)>. Acesso em: 20 jul. 2009.
- KNOTHE, G. et al. *Manual do biodiesel*. Curitiba: Edgard Blucher, 2006.
- LAGO, D. F. *Manutenção de redutores de velocidade pela integração das técnicas preditivas de análise de vibrações e análise de óleo lubrificante*. Ilha Solteira, 2007. 179f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- LOCKWOOD, F. E.; DALLEY R. Lubricant analysis. In: HENRY, S. D. et al. *ASM handbook: friction, lubrication, and wear technology*. Metals Park: The Materials Information Society, 1992. v.18, p.299-312.
- MALPICA, L. G. *Manutenção preditiva de motores de combustão interna, à gasolina, através da técnica de análise de lubrificantes*. Ilha Solteira, 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- MATTEI, L. F. *Programa nacional para a produção de biodiesel no Brasil (PNPB): trajetória, situação atual e desafios*. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/9/79.pdf>>. Acesso em: 5 fev. 2009.
- MB DO BRASIL. *O Biodiesel*. Mb do Brasil- consultoria em biocombustíveis. Disponível em: <<http://mbdobrasil.com.br/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=8>>. Acesso em: 22 jan. 2009.
- MOURA, C. R.; CARRETEIRO, R. P. *Lubrificantes e lubrificação*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1978. v.1.
- PARENTE, J. E. *Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado*. Fortaleza: Tecbio, 2003.
- PENTEADO, R. A. N. et al. Biodiesel: uma sinopse das conjunturas brasileiras e mundial. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2, 2007, Brasília. *Anais...* Brasília, DF: MCT, 2007.
- PETROBRAS. *Lubrificantes: fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Petrobras. 1999.
- ROYLANCE, B. J.; HUNT, T. M. *Wear debris analysis*. Oxford: Coxmoor Publishing Company, 1999.

SILVA, M. V. *Efeitos do uso do Biodiesel sobre propriedades do óleo lubrificante de um motor de ignição por compressão*. São Carlos, 2006. 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

SILVA JÚNIOR, A. I. et al. *Absorção atômica*. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2006. (Apostila de Espectrofotometria de Absorção Atômica).

## 17

# Uso de etanol para a produção de hidrogênio e acionamento de motor aeronáutico flex

*José Luz Silveira, Wendell de Queiróz Lamas,  
Márcio Evaristo da Silva, Lúcia Bollini Braga,  
Adriana Aparecida dos Santos Costa, Cristiane Aparecida Martins*

### **Análise experimental da reforma a vapor de etanol: aspectos técnicos, econômicos e ecológicos**

A substituição de derivados de petróleo por biocombustíveis é positiva para a qualidade do ar local. Os biocombustíveis são menos tóxicos que os combustíveis fósseis e seus processos produtivos são menos agressivos ao meio ambiente, além disso, os rejeitos de sua produção podem ser reciclados e até mesmo utilizados para gerar bioeletricidade, como é o caso do etanol brasileiro produzido da cana-de-açúcar, cuja produção de cana-de-açúcar é da ordem de 80 t/ha (Nogueira, 2009).

De acordo com Souza e Macedo (2010), por produzir menos Gases de Efeito Estufa (GEE) que a gasolina e o diesel, o etanol é uma importante alternativa para a mitigação das mudanças climáticas, especialmente para os países que, por força do Protocolo de Kyoto, necessitam reduzir suas emissões. Segundo avaliação da OEDC em 2008 (OECD, 2008), a partir dos resultados de análises das emissões de GEE ao longo do ciclo de vida de biocombustíveis produzidos por diferentes rotas tecnológicas, conforme demonstra a Tabela 17.1, o etanol de cana-de-açúcar emite entre 50% e 60% menos GEE do que a gasolina, podendo essa marca superar 100% se for considerado o aproveitamento de subprodutos da indústria sucroalcooleira para a geração de eletricidade. Resultados mais modestos são encontrados

para o etanol de milho, que permitem reduzir as emissões em 35%; para o etanol de trigo, que permitem reduzir as emissões em 34%; e o de beterraba, que permite uma redução média de 45%.

Além disso, pode-se observar na Tabela 17.1 que o etanol obtido da cana-de-açúcar, quando comparado às outras fontes primárias (milho, trigo e beterraba), apresenta outras vantagens, tais como maior produtividade (litros/hectares), e apresenta maior quantidade de energia contida no etanol por unidade de energia fóssil utilizada para produzi-lo com menor custo de produção.

Tabela 17.1 – Produtividade, balanço energético, redução das emissões e custo de produção

Matéria-prima	Cana-de-açúcar	Milho	Trigo	Beterraba
País	Brasil	EUA	UE	UE
Produtividade (litros/hectare)	7.000	3.800	2.500	5.500
Balanço energético	9,3	1,4	2	2
Redução das emissões de GEE	90%	35%	34%	45%
Custo produção de etanol (US\$ cents por litro)	22	40	68	68

Fonte: Souza et al. (2010)

Além do elevado rendimento na etapa agrícola, decorrente da alta eficiência fotossintética da cana-de-açúcar, uma das razões da elevada produtividade e do menor custo do etanol produzido no Brasil é o aproveitamento do bagaço da cana não só para energia para o processo em plantas de cogeração, mas, também, para produzir excedentes substanciais. Esses excedentes são vendidos para concessionárias de distribuição de energia elétrica ou para grandes consumidores.

O setor sucroalcooleiro é o maior autoprodutor de energia elétrica no país e, também, o maior gerador de excedentes de energia elétrica para a rede pública. A utilização de caldeiras de alta pressão e de turbinas a vapor eficientes, junto com diminuições no consumo energético específico das usinas, tem permitido a geração crescente de excedentes de eletricidade. A mecanização gradual da colheita da cana-de-açúcar tem disponibilizado parte da palha da cana para ser queimada nas unidades de cogeração, contribuindo para incrementar ainda mais esses excedentes.

A regulamentação final da Renewable Fuel Association (RFA, 2009) foi anunciada em fevereiro de 2010 e a Environmental Protection Agency (EPA) (Usepa, 2009) designou o etanol de cana-de-açúcar como bicom-

bustível avançado, capaz de reduzir as emissões de gases do efeito estufa em pelo menos 50%, comparado com a gasolina. Como as emissões de GEE ao longo do ciclo de vida de um combustível ocorrem ao longo do tempo, a EPA sugeriu, para calcular as emissões, a consideração do aspecto temporal das emissões em um horizonte de trinta anos, sem considerar peso diferente às emissões presentes e futuras.

A EPA (Usepa, 2009) ratificou ainda que o etanol brasileiro atinge uma redução de emissão de gases de efeito estufa (GEE, do inglês *Greenhouse Gases* – GHG) superior às exigências mínimas de todas as categorias. O cálculo da EPA (Usepa, 2009) aponta redução média de 61% quando comparado com a gasolina, utilizando um prazo de compensação de trinta anos para emissões ligadas a efeitos indiretos do uso da terra, ILUC (*Indirect Land Use Change*). O etanol de milho, utilizando as melhores práticas industriais (ou seja, com uso de eletricidade gerada com gás natural), reduz emissões somente em 21%, mas a média americana ainda fica bem abaixo.

## A matriz energética brasileira

A matriz energética brasileira, e em especial a matriz elétrica calcada especialmente na geração hidroelétrica (72%), possui caráter ímpar em termos de reduzido impacto ambiental, em especial no que se refere às emissões de gases de efeito estufa (Souza; Macedo, 2010).

A Tabela 17.2 apresenta o perfil das emissões brasileiras comparando com a de outros países. Observa-se que a maior parte das emissões brasileiras é relativa à coluna LULUCF (*Land Use, Land Use Change, and Forestry*), que inclui as queimadas. Por sua vez, as emissões do setor de energia respondem apenas por 8,8% do total.

Nesse contexto, evidencia-se a importância da eletricidade na manutenção de uma matriz com reduzida intensidade em carbono, contribuindo, dessa forma, para a mitigação das alterações climáticas. Especialmente porque, nesse caso, a eletricidade é uma fonte de energia intrinsecamente complementar à geração hídrica, pois a safra da cana-de-açúcar coincide com o período de seca e, também considerando o ciclo expansivo do setor sucroenergético associado ao gradativo fim da queima da cana, garante a biomassa necessária para geração de significativos montantes de eletricidade nos próximos anos.

Tabela 17.2 – Perfil das emissões do Brasil e de outros países selecionados (%)

Região/País	Energia	Transporte	Processos industriais	Agricultura	LULUCF	Lixo	Total
Mundo	48,8	11,8	3,4	13,8	18,6	3,6	100
China	64,6	4,6	7,9	21,4	-1	2,5	100
Índia	52,3	6,8	3,5	34,8	-2,2	4,8	100
Indonésia	7,9	2	0,5	4	83,6	1,9	100
Coreia do Sul	68,8	17,5	9,2	2,8	0,2	1,6	100
Brasil	8,8	5,7	1,5	20,1	62	1,8	100
México	50,5	16,6	3,5	8,2	15,8	5,3	100
África do Sul	73,7	9,6	2,7	10,7	0,5	2,9	100

Fonte: Souza; Azevedo (2006)

## Produção de hidrogênio

O hidrogênio é o elemento mais simples e mais abundante no universo; é o combustível que apresenta a maior quantidade de energia por unidade de massa (PCI = 119.950 kJ/kg). No entanto, o hidrogênio nunca ocorre isoladamente, ou seja, na natureza ele sempre aparece combinado a outros elementos, como oxigênio, nitrogênio e carbono, mas pode ser obtido a partir de várias matérias-primas, utilizando-se diversas tecnologias. Dentre as várias matérias-primas, incluem-se os recursos fósseis como carvão, gás natural e petróleo, e recursos renováveis como a biomassa, luz solar e vento (Silva et al., 2009).

De acordo com o Centro de Gestão de Estudos Estratégicos (CGEE, 2010), essa característica do hidrogênio, que é a possibilidade de sua produção por meio de diversos insumos e processos, o coloca como um elemento de integração entre diversas tecnologias, como pode ser observado na Figura 17.1.

A Tabela 17.3 apresenta a produção mundial de hidrogênio para grandes consumidores, na qual se pode observar que as fontes primárias não renováveis, ou fósseis, são responsáveis por mais de 95% da produção.

A maior parte da produção de hidrogênio, atualmente, é obtida por meio da reforma a vapor de combustíveis, em grande escala, como pela reforma a vapor do gás natural, e em menor escala, pela eletrólise da água e outros processos. Os equipamentos utilizados nesses casos são os refor-

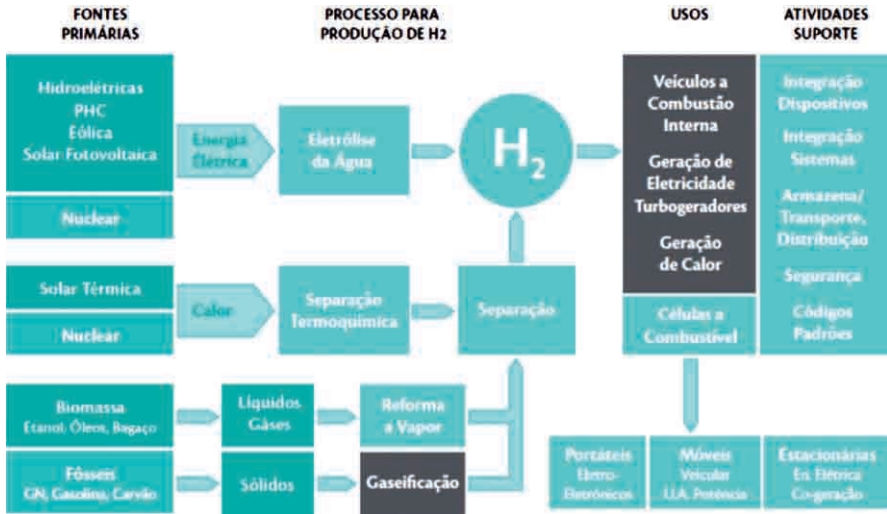


Figura 17.1 – Possíveis rotas para produção e utilização do hidrogênio como vetor energético.  
Fonte: CGEE (2010)

Tabela 17.3 – Produção mundial de hidrogênio para grandes consumidores segundo as fontes utilizadas

Fonte	Volume ( $10^9 \text{ m}^3 \text{ ano}^{-1}$ )	Participação (%)
Gás natural	19,6	48
Petróleo	12,2	30
Carvão	7,3	18
Eletrolise (fontes diversas)	1,6	4
Total	40,7	100

Fonte: Tolmasquim (2003)

madores de combustíveis e os eletrolisadores de água. O método de produção de hidrogênio varia, em relação à disponibilidade de matéria-prima, à quantidade requerida e de acordo com a pureza exigida. Os principais processos de produção de hidrogênio podem ser divididos em três áreas principais: eletrolítica, fotolítica e termoquímica (Silva et al., 2009; U. S. Department of Energy, 2010).

Dentre os processos produtivos de hidrogênio, destaca-se o processo de reforma a vapor por ser o processo mais usual das tecnologias nas indústrias

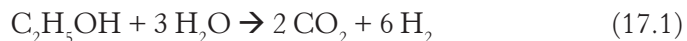


químicas. A eficiência da reforma é obtida a partir do estudo físico-químico das propriedades da matéria-prima a ser reformada, das condições termodinâmicas (temperatura e pressão da reação), do modelo e das dimensões do reformador, do catalisador e os fluxos da matéria-prima e da água. O método a ser utilizado depende do tipo célula a combustível que será alimentada. Alguns tipos de células exigem hidrogênio puro, enquanto outros tipos admitem certas impurezas. A reforma a vapor ocorre na presença de um catalisador e o gás de síntese é composto por hidrogênio, monóxido de carbono, dióxido de carbono e metano, entre outros (Silveira et al., 2008).

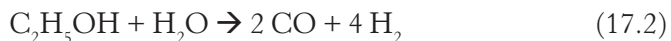
## Reações da reforma

Souza et al. (2006) apresentam as sequências de reações principais envolvidas no processo de reforma de etanol:

- *Reação global*: é uma reação endotérmica entre etanol e água, ambos em estados gasosos, gerando como produto dióxido de carbono e hidrogênio, como indica a reação da Equação (17.1).



- *Reação de reforma a vapor*: a Equação (17.2) mostra essa reação, onde são produzidos monóxido de carbono e hidrogênio.



- *Reação Water Gas Shift*: dependendo do tipo de célula a ser alimentada, faz-se necessário um processo adicional, já que o monóxido de carbono pode causar danos ao catalisador de alguns tipos de células. A reação “*Shift*”, como mostra a Equação (17.3), é exotérmica reversível e ocorre em baixas temperaturas.



- *Metanação*: várias reações químicas ocorrem simultaneamente no processo; uma delas é a de formação de metano, como é apresentada pela Equação (17.4).



- *Reação de Bouduard*: essa reação, representada pela Equação (17.5), descreve a produção de carbono a partir de monóxido de carbono.



## Protótipo de reformador de etanol

Os reformadores, de modo geral, são dispositivos que convertem o etanol em um gás de síntese rico em hidrogênio. Esse gás é, então, submetido a uma etapa de purificação para quantificá-lo e qualificá-lo às exigências de sua aplicação. Os componentes principais do reformador a vapor de etanol são: bomba dosadora; vaporizador; reator catalítico de reforma (reformador); e um reator catalítico de troca água-gás (reator *shift*).

A bomba dosadora realiza a alimentação da mistura líquida (água e etanol) e o vaporizador promove a vaporização da mistura de combustível (etanol anidro) e água para alimentar o primeiro reator catalítico. É uma etapa que requer alta temperatura, onde ocorrem as reações de reforma a vapor que formam uma mistura gasosa rica em hidrogênio. Em seguida, essa mistura gasosa é submetida ao processo catalítico do reator *shift* que remove parte do CO e produz hidrogênio adicional para o gás de síntese do processo.

As Figuras 17.2 e 17.3 mostram os reformadores de etanol, protótipos I e II, desenvolvidos pelo Grupo de Otimização de Sistemas Energéticos (Gose), da Universidade Estadual Paulista, *campus* de Guaratinguetá (Unesp-FEG).

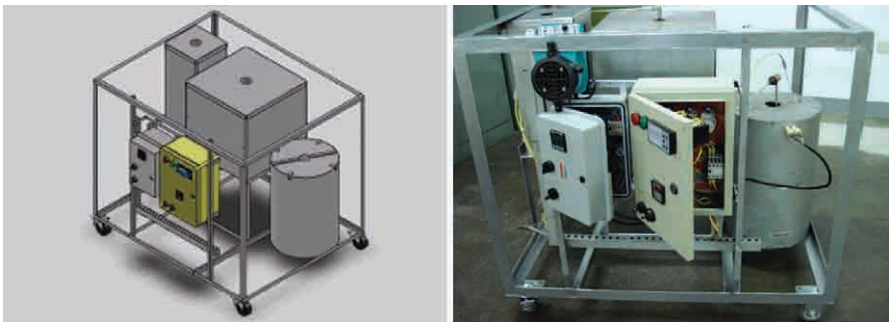


Figura 17.2 – Reformador de etanol: protótipo I

Pode-se observar na Figura 17.3 o esquema com os componentes do sistema de produção de hidrogênio por meio da reforma a vapor do etanol, seguido por um sistema de purificação do gás de síntese, operando com duas colunas em ciclos PSA (*Pressure Swing Adsorption*). O gás de síntese rico em hidrogênio após o sistema de reforma a vapor é submetido a um sistema de purificação por adsorção molecular PSA para minimizar as impurezas, principalmente as concentrações de CO.

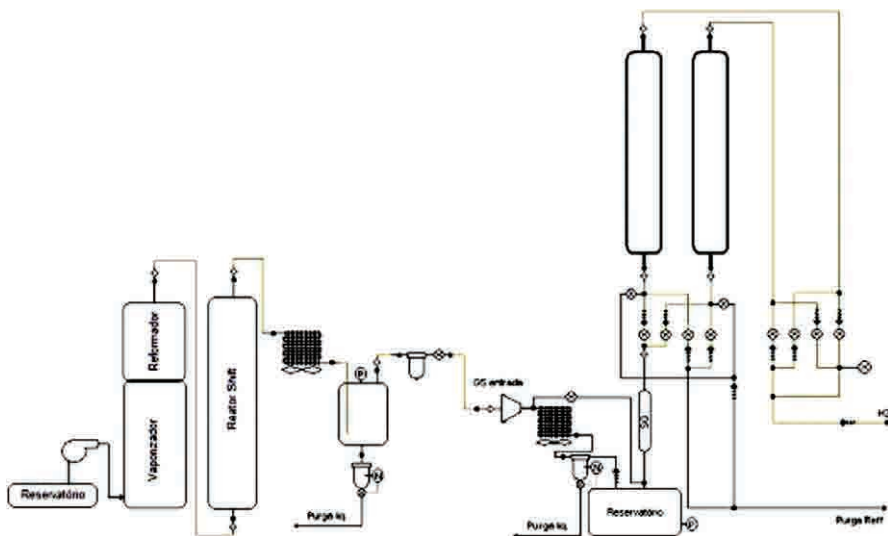


Figura 17.3 – Reformador de etanol: protótipo II

A Figura 17.4 mostra o sistema de reforma a vapor do etanol proposto associado às tecnologias de células a combustível. De acordo com as tecnologias de células a combustível e as características do sistema de reforma a vapor, é possível implementar a operação em conjunto do processo de reforma a vapor com vários tipos de células a combustível.

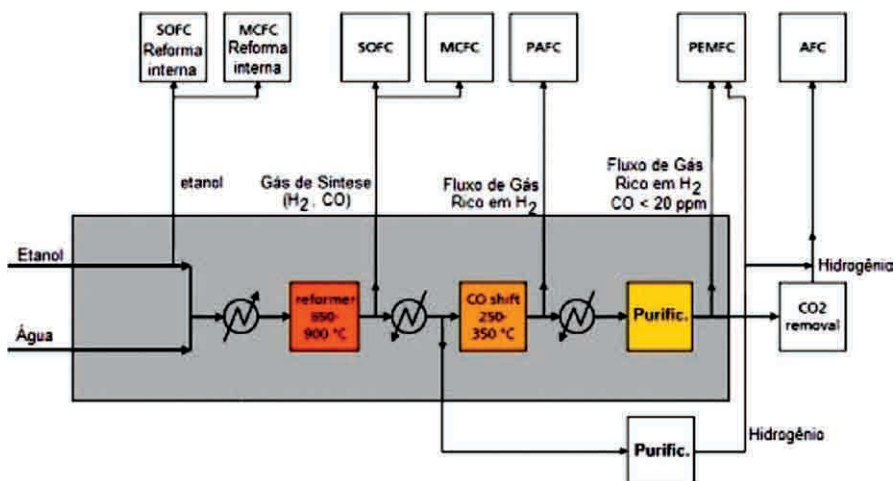


Figura 17.4 – Sistema de reforma a vapor de etanol e as tecnologias de células a combustível  
Fonte: Adaptado de Ainche (2005)

A qualificação e quantificação dos produtos do processo de reforma a vapor de etanol dos protótipos reformadores foram determinadas por cromatografia gasosa, utilizando-se o cromatógrafo gasoso Varian CP-4900 Micro-GC, Figura 17.5. O cromatógrafo foi especificado para operar com uma configuração de três canais independentes para garantir a análise dos componentes presentes no gás de síntese do processo de reforma a vapor.

A Tabela 17.4 apresenta o resultado da análise cromatográfica do gás de síntese obtido nos ensaios experimentais do sistema de reforma a vapor de etanol protótipo reformador II.

Podem-se observar uma alta produção de hidrogênio e baixas concentrações de CO, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>, sugerindo que as reações de reforma e de deslocamento água-gás foram altamente favorecidas nas temperaturas de reação, respectivamente, a 923 K e 493 K.



Figura 17.5 – CP-4900 Micro-GC para a análise de gases

Tabela 17.4 – Resultado da análise do gás de síntese – antes e após a purificação

Amostras	H <sub>2</sub> (%mol/mol)	C <sub>O</sub> (%mol/mol)	CH <sub>4</sub> (%mol/mol)	CO <sub>2</sub> (%mol/mol)
Gás de síntese – reformador	75,24	8,64	6,79	8,12
Gás de síntese – reformador/ purificador	99,84	< 1	< 1	< 1

Além disso, os resultados do gás de síntese, coletado depois do sistema de purificação por adsorção molecular PSA (*Pressure Swing Adsorption*), mostram um fluxo de gás rico em hidrogênio, isto é 99,84% mol/mol de H<sub>2</sub> e baixas % mol/mol de CO, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. O fluxo de gás de síntese rico em H<sub>2</sub> obtido após o sistema de purificação possibilita a utilização do hidrogênio produzido como insumo para produção de eletricidade em células a combustível do tipo PEM.

## Análise econômica da produção de hidrogênio

### Metodologia da análise econômica

A metodologia de análise econômica está fundamentada nos cálculos de engenharia econômica. Considera o investimento no sistema de produção de hidrogênio, os custos de insumos, o custo de operação, o custo de manutenção, a eficiência de conversão, a potência suprida pelo combustível, o período equivalente de utilização, a taxa anual de juros e o fator de anuidade. O objetivo é determinar o custo (US\$/kWh) do hidrogênio produzido na reforma de etanol.

## Determinação do custo da produção de hidrogênio em US\$/kWh

De acordo com Souza (2005), para se determinar o custo de produção de hidrogênio produzido, pode-se utilizar a Equação (17.6).

$$C_{H_2} = \frac{Inv_{REF} \cdot f}{H \cdot \dot{E}_{H_2}} + C_{OP} + C_{MAN} \quad (17.6)$$

onde:

- $C_{H_2}$  = custo da produção do hidrogênio [US\$/kWh];
- $Inv_{REF}$  = investimento no sistema de produção de hidrogênio [ $\times 10^4$  US\$];
- $f$  = fator de anuidade [1/ano];
- $E_{H_2} = m_{H_2} \times PCI_{H_2}$  [kW];
- $H$  = período equivalente de utilização [h/ano];
- $C_{OP}$  = custo de operação [US\$/kWh];
- $C_{MAN}$  = custo de manutenção [US\$/kWh].

O custo específico de investimento para o processo de reforma pode ser estimado na faixa de US\$ 50.000 a US\$ 8.000.000, respectivamente, para a faixa de produção de hidrogênio de  $1\text{Nm}^3/\text{h}$  e  $1.500\text{Nm}^3/\text{h}$  (Silveira et al., 2006; Barthel et al., 2004; Kotharir, 2008; Ciambelli et al., 2009).

Para uma maior desagregação e de modo a construir curvas de custos de investimentos em reformadores, optou-se pelo uso da técnica de Boehm (1987), para a estimativa desses valores (Camargo et al., 2003), a qual se baseia na Equação (17.7).

$$C = C_r \cdot \left( \frac{S}{S_r} \right)^m \quad (17.7)$$

onde:

- $C$  = custo do equipamento para uma grandeza de interesse  $S$ ;
- $m$  = fator de incidência que indica a escala de economia (0,5 – 1,0);
- $C_r$  = custo do equipamento para uma grandeza de referência  $S_r$ .

Para aplicar a técnica de Boehm (1987), ilustrada no Gráfico 17.1, são requeridas as seguintes etapas:

- caracterização do equipamento;
- identificação de  $C_r$ ,  $S_r$  e  $m$ ;
- correção por opções típicas de equipamentos.

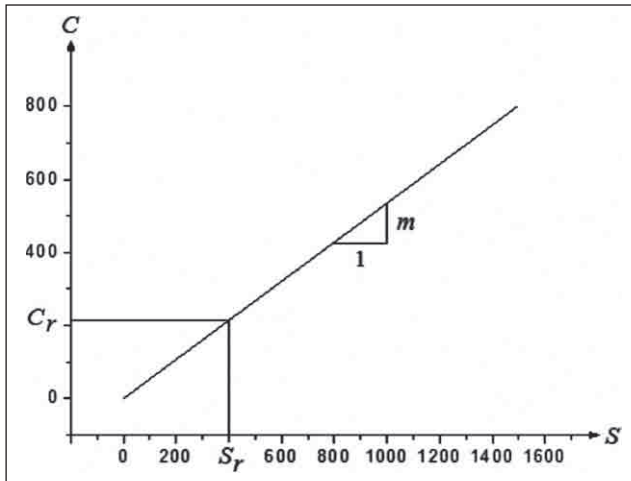


Gráfico 17.1 – Metodologia para a determinação do custo do equipamento

Utilizando a Equação (17.8), pode-se determinar o investimento ( $Inv_{REF}$ ) em reformadores a vapor de acordo com a capacidade de vazão de hidrogênio.

$$Inv_{REF} = 400 \cdot \left( \frac{m_{H_2}}{750} \right)^{0,5304} \quad (17.8)$$

onde:

- $Inv_{REF}$  = investimento no sistema de produção de hidrogênio [ $\times 10^4$  US\$];
- $m_{H_2}$  = capacidade de produção de hidrogênio em [ $Nm^3/h$ ].

O custo de operação para o reformador é reduzido, em razão da introdução de seus sistemas de automação e controle. Dessa forma, o custo de operação depende basicamente da fonte de calor utilizada no sistema de reforma e do insumo etanol.

Nesta análise, foram consideradas as seguintes fontes: bagaço de cana-de-açúcar ou eletricidade para a vaporização da mistura (etanol anidro e água destilada) e para manter as condições endotérmicas da reforma catalítica (não se considera aqui a possibilidade de uso do etanol hidratado para a reforma).

No caso do consumo do bagaço de cana-de-açúcar como fonte de calor, o custo de operação é obtido por meio da Equação (17.9).

$$C_{OP} = \frac{E_{\text{comb(cons)}} \cdot C_{\text{comb}}}{E_{H_2}} + \frac{E_{\text{EtOH}} \cdot C_{\text{EtOH}}}{E_{H_2}} \quad (17.9)$$

onde:

- $E_{\text{comb(cons)}}$  = potência suprida pelo bagaço de cana-de-açúcar [kW];
- $C_{\text{comb}}$  = custo do combustível (bagaço de cana-de-açúcar) [US\$/kWh];
- $E_{\text{EtOH}}$  = potência armazenada no etanol [kW];
- $E_{\text{EtOH}} = m_{\text{EtOH}} \times \text{PCI}_{\text{EtOH}}$  [kW];
- $m_{\text{EtOH}}$  = vazão mássica do etanol [kg/s];
- $\text{PCI}_{\text{EtOH}}$  = poder calorífico inferior do etanol [kJ/kg];
- $C_{\text{EtOH}}$  = custo do etanol [US\$/kWh];
- $E_{H_2} = m_{H_2} \times \text{PCI}_{H_2}$  [kW];
- $m_{H_2}$  = vazão mássica do hidrogênio [kg/s];
- $\text{PCI}_{H_2}$  = poder calorífico inferior do hidrogênio [kJ/kg].

No caso do consumo de eletricidade como fonte de calor, o custo de operação é obtido por meio da Equação (17.10). Ressalta-se que o uso de eletricidade como fonte de calor apenas é aconselhada para protótipos em pequena escala de produção.

$$C_{OP} = \frac{E_{\text{elet(cons)}} \cdot C_{\text{elet}}}{E_{H_2}} + \frac{E_{\text{EtOH}} \cdot C_{\text{EtOH}}}{E_{H_2}} \quad (17.10)$$

onde:

- $E_{\text{elet(cons)}}$  = potência elétrica consumida [kW];
- $C_{\text{elet}}$  = custo da eletricidade [US\$/kWh];
- $E_{\text{EtOH}}$  = potência armazenada no etanol [kW].

De acordo Kothari et al. (2008), o custo de manutenção do sistema de reforma pode ser considerado como sendo 3% do valor de investimento, conforme mostra a Equação (17.11).

$$C_{MAN} = 0,03 \cdot \frac{\text{Inv}_{REF} \cdot f}{H \cdot \dot{E}_{H_2}} \quad (17.11)$$

onde:

- $\text{Inv}_{REF}$  = investimento no sistema de produção de hidrogênio [x10<sup>4</sup> US\$];



- $H$  = período equivalente de utilização [h/ano];
- $E_{H_2} = m_{H_2} \times PCI_{H_2}$  [kW];
- $f$  = é o fator de anuidade [1/ano], o qual é calculado de acordo com as Equações 17.12 e 17.13.

$$f = \frac{q^k \cdot (q - 1)}{q^k - 1} \quad (17.12)$$

$$q = 1 + \frac{r}{100} \quad (17.13)$$

onde:

- $k$  = período de amortização ou *pay-back* [anos];
- $r$  = taxa anual de juros [%].

### Resultados da análise econômica – custo de produção de hidrogênio em US\$/kWh: Protótipo Reformador

Para o estudo da viabilidade econômica associada ao sistema de reforma a vapor de etanol, foram feitas as seguintes considerações:

- Para os itens de custo em que a referência está em moeda nacional, utilizou-se a taxa de câmbio US\$ 1,00 = R\$ 1,80;
- Consumo experimental de etanol no sistema de reforma a vapor: 0,7961 L/h para 1 Nm<sup>3</sup>/h de H<sub>2</sub>;
- Consumo de energia elétrica do protótipo reformador: 1,9 kWh;
- Consumo de bagaço de cana-de-açúcar para manter as condições endotérmicas do processo: 1,23 kg/h;
- Taxa anual de juros: valores variando entre 4% e 12%;
- Horas de operação: 5.000 h/ano, 6.000 h/ano e 7.000 h/ano;
- Período de amortização ou *pay-back*: valores variando entre dois e 12 anos;
- Custo do etanol anidro: 0,4 R\$/L (0,222 US\$/L), valor estimado considerando o custo de produção do etanol derivado da cana-de-açúcar;
- Custo do bagaço da cana-de-açúcar: considerando-se a grande oscilação de preços dependendo da época da safra. No início da safra, por exemplo, quando da partida da moagem, pode atingir valores acima de 30,00 R\$/t. Por sua vez, em plena safra, o bagaço de cana é ofertado a preços praticamente nulos. Neste trabalho foi adotado um preço intermediário de 7,17 US\$/t de bagaço de cana;

- Tarifa de energia elétrica: 0,27396 R\$/kWh (0,1522 US\$/kWh). Preço da energia elétrica para o setor comercial e de serviços na Região Sudeste (Sistema de Apoio à Decisão, 2010).

O Poder Calorífico Inferior (PCI) dos combustíveis utilizados e do  $H_2$  compreende:

- Etanol: 28.300 kJ/kg (CTC, 2010);
- Bagaço da cana-de-açúcar: 7.320 kJ/kg (Braga, 2010)
- $H_2$ : 119.950 kJ/kg (Silva, 2005).

Utilizando-se essas considerações e as Equações (17.6) a (17.13), os resultados da análise econômica da produção de hidrogênio via reforma a vapor do etanol no protótipo reformador são apresentados a seguir.

O Gráfico 17.2 apresenta o custo da produção de hidrogênio em razão do período de amortização do investimento (*pay-back*), variando-se as taxas anuais de juros entre 4% e 12% para 5.000 h/ano, 6.000 h/ano e 7.000 h/ano de operação, para um reformador consumindo eletricidade para produzir 1  $Nm^3/h$  de hidrogênio, a partir de etanol.

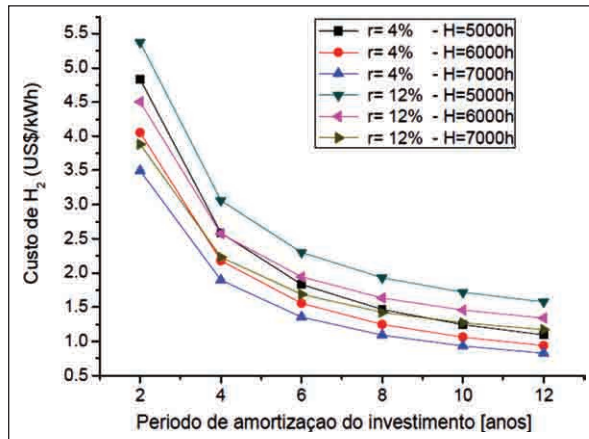


Gráfico 17.2 – Custo da produção de hidrogênio em razão do período de amortização do investimento (fonte de calor: eletricidade; protótipo de 1  $Nm^3/h$  de  $H_2$ )

Pode-se observar que os custos diminuem com o aumento do período de amortização do capital, com a diminuição da taxa anual de juros e com o aumento do período equivalente de utilização. Os custos de investimento influenciam significativamente no custo final do hidrogênio produzido. Já

a influência dos custos de operação se deve ao consumo de eletricidade para vaporizar a mistura água-etanol e, especialmente, pelo consumo de etanol no processo de reforma a vapor.

O Gráfico 17.3 apresenta o custo da produção de hidrogênio em razão das taxas anuais de juros para um período equivalente de utilização de 7.000 h/ano, variando-se o período de amortização do investimento ( $k$ ) entre dois e 12 anos.

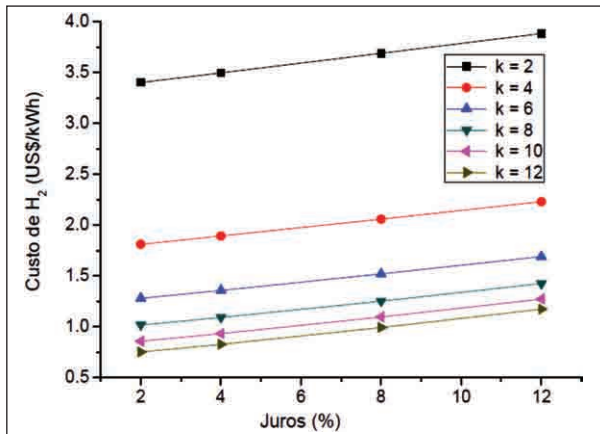


Gráfico 17.3 – Custo da produção de hidrogênio em razão da taxa anual de juros, 7.000 h/ano (fonte de calor: eletricidade; protótipo de 1 Nm<sup>3</sup>/h de H<sub>2</sub>)

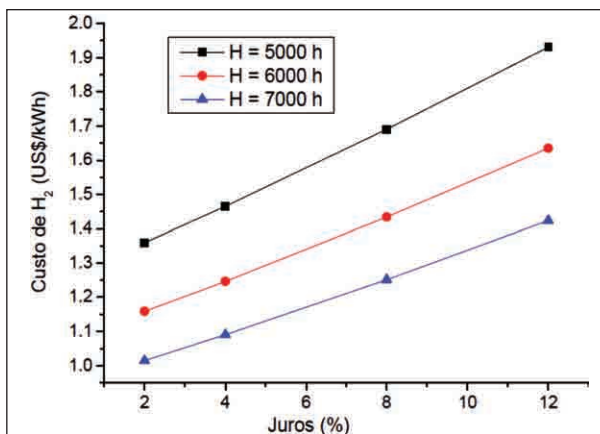


Gráfico 17.4 – Custo da produção de hidrogênio com o reformador em razão da taxa anual de juros e horas/ano de operação (fonte de calor: eletricidade; protótipo de 1 Nm<sup>3</sup>/h de H<sub>2</sub> e pay-back de oito anos)

Observa-se no Gráfico 17.3 que maiores *pay-backs* implicam menores custos da produção de hidrogênio. Já no Gráfico 17.4, verifica-se que o aumento do período equivalente de utilização acarreta em uma diminuição no custo do hidrogênio produzido.

Para verificar a influência do insumo utilizado como fonte de calor foi realizada uma análise comparativa do custo do hidrogênio produzido pelo protótipo reformador, na qual se comparou o custo do hidrogênio produzido com o sistema operando com eletricidade ou bagaço de cana. Foi constatado na análise comparativa que o custo do hidrogênio é menor quando se utiliza o bagaço de cana como fonte de calor para o processo de reforma, cujos resultados são apresentados no Gráfico 17.5.

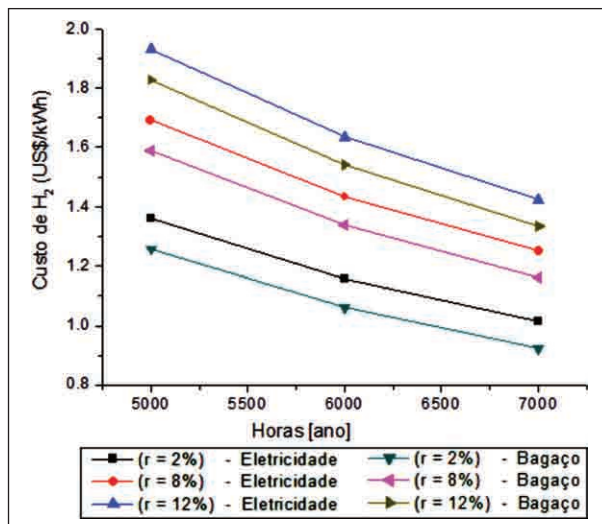


Gráfico 17.5 – Custo da produção de hidrogênio em razão do tempo de operação com variação das taxas de juros e da fonte de calor (energia elétrica ou bagaço); protótipo de 1 Nm<sup>3</sup>/h de H<sub>2</sub> e *pay-back* de oito anos

Observa-se que o custo do hidrogênio produzido, quando se utiliza o bagaço como fonte de calor para o sistema de reforma, é aproximadamente 10% menor do que o custo do hidrogênio produzido com o sistema operando com eletricidade.

Além dos estudos relacionados ao protótipo de reforma de 1 Nm<sup>3</sup>/h de hidrogênio, foi determinado o custo do hidrogênio para sistemas de reforma com maiores capacidades de produção (até 1.000 Nm<sup>3</sup>/h de H<sub>2</sub> operando com bagaço de cana como fonte de calor).

O Gráfico 17.6 mostra os custos do hidrogênio produzido para sistemas de reforma a vapor de etanol em razão da capacidade de produção do reformador.

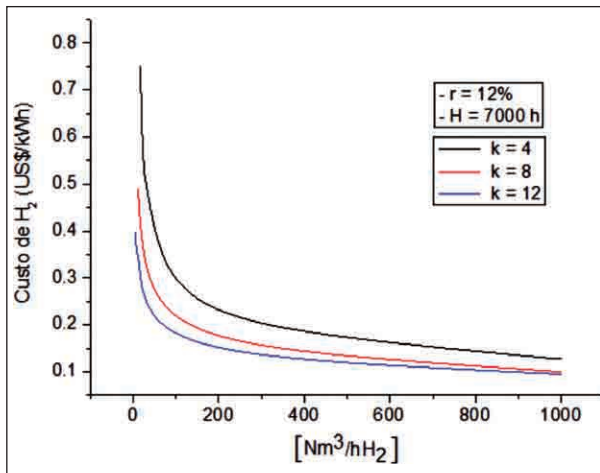


Gráfico 17.6 – Custo do hidrogênio em razão da capacidade de produção do sistema de reforma (fonte de calor: bagaço de cana;  $H = 7.000 \text{ h/ano}$ ;  $r = 12\%$ )

Verifica-se que o custo do hidrogênio produzido diminui com o aumento da capacidade de produção, apresentando uma diminuição mais significativa para reformadores de etanol com capacidades de produção abaixo  $100 \text{ Nm}^3/\text{h}$  de hidrogênio, conforme se pode observar no Gráfico 17.6.

Para sistemas de reforma com capacidades de produção superiores a  $100 \text{ Nm}^3/\text{h}$  de  $\text{H}_2$ , também se observou diminuição nos custos do hidrogênio, embora com menor efeito. Considerando a dependência do custo do hidrogênio em razão da variação do período de amortização, foi notado comportamento semelhante. Isto é, com o aumento do período de amortização do capital, tem-se uma diminuição no custo do hidrogênio produzido.

É observado, portanto, por meio dessa análise econômica, que a utilização do bagaço de cana em sistemas reformadores é uma opção viável, pois agrega uma redução significativa no custo do hidrogênio produzido quando comparado com a utilização da energia elétrica para a reforma do etanol. Além disso, tem-se a produção de hidrogênio combustível, com custos em US\$/kWh atrativos que corrobora economicamente a proposta de inovação da cadeia produtiva do etanol por meio da incorporação da reforma a vapor a usina sucroalcooleira desenvolvida na seção sobre análise de eficiência ecológica.

## Análise de eficiência ecológica da produção de hidrogênio

### Metodologia da análise de eficiência ecológica

A metodologia de análise ecológica baseia-se nos cálculos do dióxido de carbono equivalente  $[(\text{CO}_2)_e]$  e do indicador de poluição  $(\Pi_g)$  para a determinação da eficiência ecológica do processo de produção de hidrogênio via reforma a vapor de etanol. Nas seções que seguem são relacionadas as equações que permitem esses cálculos.

### Cálculo do dióxido de carbono equivalente $[(\text{CO}_2)_e]$ e do indicador de poluição $(\Pi_g)$

Baseando-se na concentração mínima permitida para o  $\text{CO}_2$  na atmosfera, que é  $10.000 \text{ mg/m}^3$  (Silveira et al., 2009), determinam-se os coeficientes equivalentes para alguns poluentes. A Tabela 17.5 apresenta valores específicos para a concentração mínima admitida para exposição de uma hora (Villela; Silveira, 2007).

Tabela 17.5 – Padrões de qualidade do ar para  $\text{NO}_x$  e  $\text{SO}_2$

Gás	Concentração máxima em 1 h ( $\text{mg/m}^3$ )
$\text{SO}_2$	125
$\text{NO}_x$	200

Fonte: Villela; Silveira (2007)

Segundo Martinelli Jr. (2008), o limite de Materiais Particulados (MP) emitidos por um processo de combustão, estabelecido pela resolução n.3, de 28 de junho de 1990, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama), é  $150 \text{ mg/m}^3$ . Baseando-se nesses padrões e considerando a concentração mínima permitida para  $\text{CO}_2$ , que é  $10.000 \text{ mg/m}^3$ , determinam-se os coeficientes  $(\text{SO}_2)_e$ ,  $(\text{NO}_x)_e$  e  $(\text{MP})_e$  para o cálculo do dióxido de carbono equivalente  $(\text{CO}_2)_e$ , cuja unidade é kg por kg de combustível ( $\text{kg/kg}_{\text{comb}}$ ), conforme apresenta a Equação (17.14) (Villela; Silveira, 2007).

$$(\text{CO}_2)_e = \text{CO}_2 + 80 \cdot (\text{SO}_2) + 50 \cdot (\text{NO}_x) + 67 \cdot (\text{MP}) \quad (17.14)$$

onde:

- $(\text{SO}_2)_e = 80 (\text{SO}_2)$  = dióxido de enxofre equivalente em  $(\text{CO}_2)$ ;
- $(\text{NO}_x)_e = 50 (\text{NO}_x)$  = dióxido de nitrogênio equivalente em  $(\text{CO}_2)$ ;
- $(\text{MP})_e = 67 (\text{MP})$  = material particulado equivalente em  $(\text{CO}_2)$ .

Para quantificar o impacto ambiental, tem-se o indicador de poluição ( $\Pi_g$ ), Equação (17.15), definido como sendo a razão entre o dióxido de carbono equivalente do combustível e seu Poder Calorífico Inferior (PCI) (Villela; Silveira, 2007; Cardu; Baica, 1999).

$$\Pi_g = \frac{(\text{CO}_2)_e}{\text{PCI}} \quad (17.15)$$

onde:

- $(\text{CO}_2)_e$  = dióxido de carbono equivalente  $[\text{kg}/\text{kg}_{\text{comb}}]$ ;
- PCI = poder calorífico inferior do combustível  $[\text{MJ}/\text{kg}_{\text{comb}}]$ ;
- $\Pi_g$  = indicador de poluição  $[\text{kg}/\text{MJ}]$ .

### Eficiência ecológica ( $\varepsilon$ )

A eficiência ecológica ( $\varepsilon$ ) é um indicador adimensional que permite avaliar o impacto ambiental das emissões gasosas de processos termoquímicos, comparando-se as emissões de poluentes integrados hipoteticamente (emissões equivalente de  $\text{CO}_2$ ) com padrões existentes de qualidade do ar. Considera-se também a eficiência de conversão como fator determinante sobre as emissões específicas, expresso por um número fracionário. A eficiência ecológica ( $\varepsilon$ ) pode ser determinada conforme a Equação (17.16).

$$\varepsilon = \left[ \frac{0,204 \cdot \eta_{\text{sistema}} \cdot \ln(135 - \Pi_g)}{\eta_{\text{sistema}} + \Pi_g} \right]^{0,5} \quad (17.16)$$

onde:

- $\varepsilon$  = eficiência ecológica  $[-]$ ;
- $\eta_{\text{sistema}}$  = eficiência termodinâmica do processo de reforma  $[-]$ ;
- $\Pi_g$  = indicador de poluição  $[\text{kg CO}_2/\text{MJ}]$ .

A eficiência ecológica ( $\varepsilon$ ) engloba em um coeficiente simples aspectos que definem a intensidade do impacto ambiental do processo, composição e combustão do combustível, indicador de poluição e eficiência de conver-

são. Desse modo, o valor da eficiência é diretamente proporcional à eficiência termodinâmica do sistema ( $\eta_{\text{sistema}}$ ) e inversamente proporcional ao indicador de poluição ( $\Pi_g$ ). O valor de  $\varepsilon$  varia entre 0 e 1. Do ponto de vista ecológico, um valor mínimo admissível para a eficiência ecológica seria igual a 0,5 (valor crítico de eficiência ecológica). Para uma situação hipotética na qual  $\varepsilon = 0$ , tem-se uma eficiência ecológica insatisfatória, ou um sistema poluidor, e quando  $\varepsilon = 1$  indica uma situação ideal (poluição zero) (Villela; Silveira, 2007). A Tabela 17.6 apresenta algumas características ambientais para combustíveis referenciais, tais como ( $\Pi_g$ ),  $(\text{CO}_2)_e$  e  $\varepsilon$ , entre outras (Villela; Silveira, 2007; Coronado-Rodriguez et al., 2009).

Tabela 17.6 – Características ambientais para combustíveis referenciais

Combustível	S (%)	$(\text{CO}_2)_e$ (kg/kg <sub>comb</sub> )	PCI (MJ/kg)	$\Pi_g$ (kg/MJ)	$\varepsilon$ (–)
Hidrogênio	0	0	119,95	0	1
Enxofre	100	1.400	9,270	134	0

## Análise do sistema de reforma a vapor de etanol

A eficiência ecológica do processo de produção de hidrogênio por reforma de etanol é calculada considerando-se a Figura 17.6.

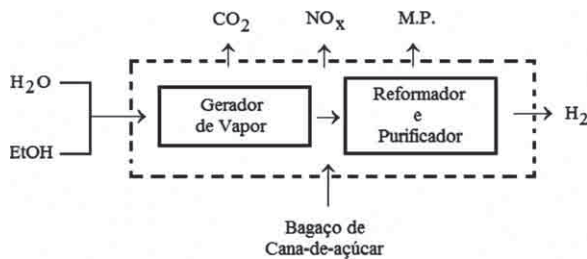


Figura 17.6 – Sistema de produção de hidrogênio por reforma a vapor de etanol

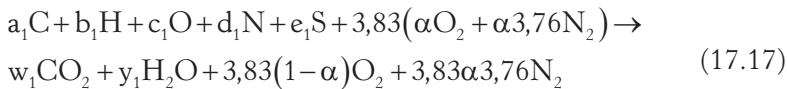
A Tabela 17.7 apresenta a composição elementar do bagaço da cana-de-açúcar em base seca, a partir da qual se determina a equação estequiométrica do processo de combustão do bagaço, apresentada na Equação (17.17). Nesse caso, como não há uma fórmula química definida para o combustível, define-se a equação de combustão para 100 g de combustível (bagaço de cana-de-açúcar) com um excesso de ar  $\alpha = 30\%$  (Lora; Nascimento, 2004; Carvalho Jr.; McQuay, 2007).



Tabela 17.7 – Características técnicas do bagaço (base seca)

Biomassa	Composição elementar (%)						Composição imediata (%)			PCI (MJ/kg)
	C	H	O	N	S	Cinza	Voláteis	Cinzas	Carbono fixo	
Bagaço	44,8	5,35	39,55	0,38	0,01	9,79	73,78	11,27	14,95	7,32

Fonte: Sales (2007).



onde:

- $\alpha = 1,30$  (considerando 30 % de excesso de ar na combustão do bagaço);
- $a_1; b_1; c_1; d_1; e_1$  são os valores dos componentes elementares do bagaço, determinados pela razão entre a composição elementar e a massa molar do respectivo elemento.

### Cálculo das emissões de CO<sub>2</sub> no processo de combustão do bagaço da cana-de-açúcar

Segundo Villela e Silveira (2007), as emissões de CO<sub>2</sub> resultantes de 1 kg de combustível podem ser calculadas de acordo com a Equação (17.18).

$$M_{CO_2} = \frac{(w_1 \cdot 44 \cdot 1)CO_2}{N} \quad (17.18)$$

onde:

- $M_{CO_2}$  = emissão de CO<sub>2</sub> [kgCO<sub>2</sub>/kg<sub>comb</sub>];
- $N$  = massa molar do combustível (bagaço) [kg/kg.mol].

A massa molar do bagaço pode ser determinada, baseando-se na composição elementar, Tabela 17.7, e na estequiometria da Equação (17.17). Isto é, pode-se calcular a massa molar do bagaço da cana-de-açúcar por meio da Equação (17.19).

$$N = (a_1 12) + (b_1 1) + (c_1 16) + (d_1 14) + (e_1 32) \quad (17.19)$$

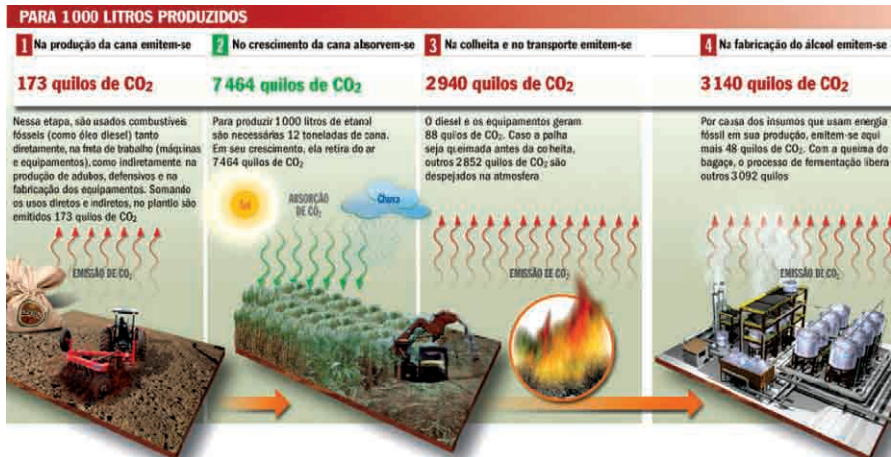
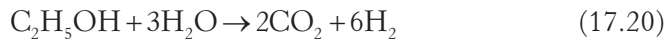
### Emissões do sistema de reforma a vapor de etanol

Para as emissões de NO<sub>x</sub>, SO<sub>2</sub> e MP, referentes à combustão do bagaço de cana-de-açúcar, foram adotados os valores sugeridos por Lora (Lora; Nascimento, 2004), apresentados na Tabela 17.8.

Tabela 17.8 – Emissões de NO<sub>x</sub>, SO<sub>2</sub> e MP na combustão do bagaço de cana-de-açúcar

Componentes	Combustão do bagaço de cana
SO <sub>2</sub> (kg <sub>SO2</sub> /kg <sub>comb</sub> )	0
NO <sub>x</sub> (kg <sub>NOX</sub> /kg <sub>comb</sub> )	0,0012
MP (kg <sub>MP</sub> /kg <sub>comb</sub> )	0,0071

Utilizando a reação estequiométrica da combustão do bagaço de cana, Equação (17.17), a reação estequiométrica global da reforma a vapor de etanol, Equação (17.20), e considerando o ciclo do CO<sub>2</sub> desde o plantio da cana-de-açúcar até a produção do etanol, apresentado na Figura 17.7, podem-se obter as emissões do sistema de reforma a vapor de etanol proposto, conforme apresentado na Figura 17.6. Para esses cálculos, foram consideradas as seguintes relações: 1 tonelada de cana-de-açúcar gera 83,33 litros de etanol e 250 quilogramas de bagaço (Cardu; Baica, 1999).

Figura 17.7 – Ciclo do CO<sub>2</sub> desde o plantio da cana-de-açúcar até a produção do etanol

Fonte: O ciclo do etanol (2008)

A Tabela 17.9 apresenta os resultados dos cálculos das emissões do processo de produção de hidrogênio por reforma de etanol representado pela Figura 17.6. Nos cálculos das emissões foram considerados dois cenários: um cenário sem considerar o ciclo do CO<sub>2</sub> ilustrado na Figura 17.7 e um outro cenário considerando o ciclo do CO<sub>2</sub>.

Tabela 17.9 – Resultado das emissões do processo de produção de hidrogênio por reforma a vapor de etanol

Componentes	Combustão do bagaço de cana		Reforma a vapor de etanol	
	Sem o ciclo	Com o ciclo	Sem o ciclo	Com o ciclo
CO <sub>2</sub> (kg <sub>CO2</sub> /kg <sub>comb</sub> )	1,82389	0,46956	0	-1,35433
SO <sub>2</sub> (kg <sub>SO2</sub> /kg <sub>comb</sub> )	0		0	
NO <sub>x</sub> (kg <sub>NOX</sub> /kg <sub>comb</sub> )	0,0012		0,0012	
MP (kg <sub>MP</sub> /kg <sub>comb</sub> )	0,0071		0,0071	

### Resultados da eficiência ecológica do sistema de reforma a vapor de etanol

Utilizando os valores de emissões de CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, SO<sub>2</sub> e MP e considerando o PCI do bagaço de cana-de-açúcar igual a 7,32 MJ/kg, determinaram-se o dióxido de carbono equivalente (CO<sub>2</sub>)<sub>e</sub> e o indicador de poluição (Π<sub>g</sub>) associados ao sistema, os quais são mostrados na Tabela 17.10.

Tabela 17.10 – Resultados para o dióxido de carbono equivalente e o indicador de poluição para o sistema proposto

(CO2) <sub>e</sub> [kg/kg <sub>comb</sub> ]		Π <sub>g</sub> [kg/MJ]	
Sem ciclo	Com ciclo	Sem ciclo	Com ciclo
2,895287	0,186621	0,39553	0,025495

Analisando-se o processo de produção de hidrogênio via reforma a vapor, representado esquematicamente pela Figura 17.6, definiu-se a expressão para o cálculo da eficiência termodinâmica do sistema ( $\eta_{\text{sistema}}$ ), apresentada na Equação (17.21).

$$\eta_{\text{sistema}} = \frac{E_{\text{H}_2}}{(E_{\text{bagaço}} + E_{\text{etanol}})} \quad (17.21)$$

onde:

- $E_{\text{H}_2} = m_{\text{H}_2} \times \text{PCI}_{\text{H}_2}$ ;
- $E_{\text{bagaço}} = m_{\text{bagaço}} \times \text{PCI}_{\text{bagaço}}$ ;
- $E_{\text{etanol}} = m_{\text{etanol}} \times \text{PCI}_{\text{etanol}}$ ;
- $\text{PCI}_{\text{H}_2} = 119,95 \text{ MJ/kg}$ ;
- $\text{PCI}_{\text{etanol}} = 28,3 \text{ MJ/kg}$ ;
- $\text{PCI}_{\text{bagaço}} = 7,32 \text{ MJ/kg}$ .

A Tabela 17.11 apresenta os resultados de eficiência termodinâmica do sistema e a eficiência ecológica, os quais indicam que a rota tecnológica proposta é pouco poluidora, pois a eficiência ecológica é próxima a 100%, considerando o ciclo do  $\text{CO}_2$  (Figura 17.7) e o sistema proposto (Figura 17.6).

Tabela 17.11 – Eficiência termodinâmica, indicador de poluição e eficiência ecológica do processo de reforma a vapor de etanol

$\eta_{\text{sistema}}$ (%)	$\varepsilon$ (%)	
	Sem ciclo	Com ciclo
55,78	76,50	97,82

Se, todavia, não for considerado o ciclo do  $\text{CO}_2$  desde o plantio da cana-de-açúcar até a produção do etanol reformado para a produção do hidrogênio, a eficiência ecológica ( $\varepsilon$ ) tende a diminuir, conforme ilustrado no Gráfico 17.7.

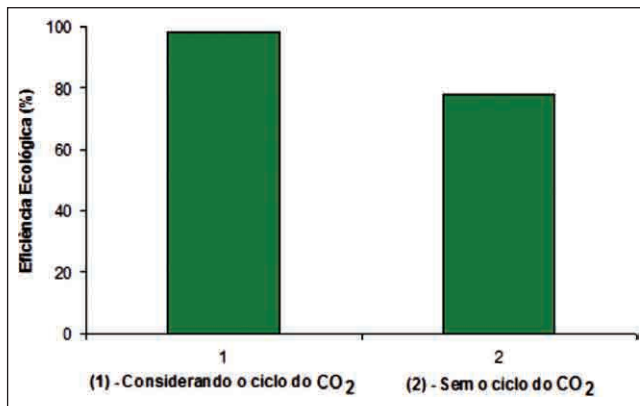


Gráfico 17.7 – Eficiência ecológica global do sistema de reforma a vapor de etanol

Pode-se observar no Gráfico 17.7 que o ciclo do dióxido de carbono interfere positivamente na eficiência ecológica do sistema de reforma a vapor do etanol, pois a quantidade de  $\text{CO}_2$  absorvida ao longo do crescimento da cana-de-açúcar é maior do que a quantidade de  $\text{CO}_2$  emitida durante plantio, colheita, produção do etanol e processo de produção de hidrogênio por reforma. Tais resultados corroboram as vantagens ambientais da produção de hidrogênio via reforma a vapor do etanol, ou seja, evidenciam que essa rota de produção de hidrogênio é ambientalmente correta.

## Abordagem sobre a incorporação do sistema de reforma à cadeia produtiva do etanol

A tecnologia da usina sucroalcooleira abrange várias operações unitárias, todas com o objetivo de transformar a cana-de-açúcar em açúcar e em álcool. Essas operações, distintas e dispostas em sequência lógica, são de naturezas química, bioquímica e física. Há uma interação entre as diversas operações unitárias desse sistema produtivo e, dessa forma, qualquer alteração em uma operação unitária influencia as demais. A etapa industrial do processamento da cana-de-açúcar pode ser dividida em cinco grandes volumes de controle: sistema de extração; planta de tratamento do caldo; produção de açúcar; produção do álcool; e sistema de cogeração.

A incorporação do processo de reforma a vapor de etanol agregará ao setor sucroalcooleiro a produção de hidrogênio, além dos produtos convencionais (etanol e açúcar). Essa incorporação consiste em uma planta convencional de produção de açúcar e álcool associada ao processo de reforma a vapor de etanol.

Nesse contexto, o etanol produzido, destinado ao mercado consumidor, passa pelo processo de desidratação no qual atinge as condições ideais de pureza e o teor alcoólico exigidos pela ANP. Uma fração do etanol produzido na usina é destinada, diretamente, ao processo de produção de hidrogênio sem a etapa de desidratação, visto que os insumos do processo de reforma a vapor de etanol são etanol e água destilada (além de calor que vem da queima do bagaço).

Após a vaporização da mistura de etanol e água destilada, há duas etapas catalíticas, e uma etapa ocorre em altas temperaturas em um dispositivo denominado de reformador, no qual ocorrem as reações de reforma a vapor SRR (*Steam Reforming Reactions*). E a outra etapa ocorre em temperaturas mais baixas em um reator denominado reator *shift*, no qual ocorrem as reações de deslocamento água-gás WGSR (*Water Gas Shift Reactions*).

De acordo com Silva (2005), uma usina sucroalcooleira padrão com capacidade de moagem de 520 toneladas de cana por hora produz 17,10 toneladas de açúcar por hora, 15.300 L/h de etanol hidratado por hora, 9.680L/h de etanol anidro. Utilizando-se a quantidade de bagaço gerado (130 t/h), pode-se estimar a produção média de energia elétrica em 6.500 kWh que supre o consumo específico de insumos energéticos da usina e

proporciona um excedente de 780 kWh. A Figura 17.8 mostra um esquema de uma usina sucroalcooleira com a incorporação da produção de hidrogênio proposta.

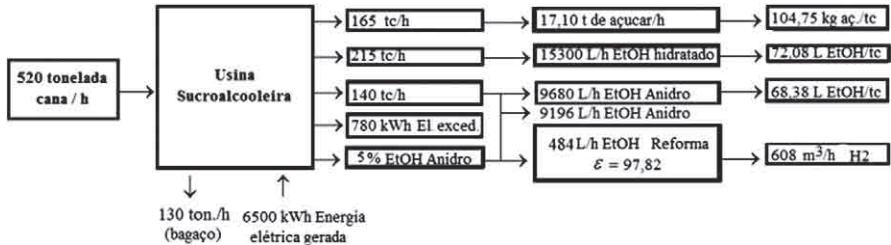


Figura 17.8 – Análise de uma usina sucroalcooleira após a incorporação da produção de hidrogênio (elaboração própria)

Considerando, contudo, a incorporação do sistema de reforma a vapor à cadeia produtiva do etanol, observa-se que a usina sucroalcooleira ganha uma nova configuração, na qual, além dos produtos convencionais, tais como açúcar, etanol anidro, etanol hidratado e eletricidade excedente, tem-se a produção de hidrogênio. Utilizando-se 5% do etanol anidro produzido, neste estudo de caso igual a 484 L/h, tem-se uma produção de hidrogênio na ordem de 608 Nm<sup>3</sup>/h. Agregando-se ao setor o potencial energético, ambiental e mercadológico do hidrogênio. Taxas maiores de etanol poderiam ser convertidas em hidrogênio, dependendo da necessidade do mercado.

Acredita-se que em um futuro próximo, na era do hidrogênio, a usina sucroalcooleira poderia ser modificada de acordo com essa proposta, conforme mostra a Figura 17.9. Nesse caso, além dos produtos convencionais da cadeia produtiva do etanol, têm-se agregado ao processo os benefícios da produção de hidrogênio combustível.



Figura 17.9 – Esquema proposto para a usina na era do hidrogênio

Fonte: Silveira et al. (2009)

A incorporação da reforma a vapor do etanol ao processo produtivo do etanol pode agregar vantagens ambientais e econômicas ao país, pois a eficiência ecológica do sistema de reforma a vapor é elevada em razão do ciclo do carbono (Figura 17.10). Além disso, essa nova configuração do setor possibilita a produção e o desenvolvimento da economia do hidrogênio com todos os seus benefícios ambientais e tecnológicos.

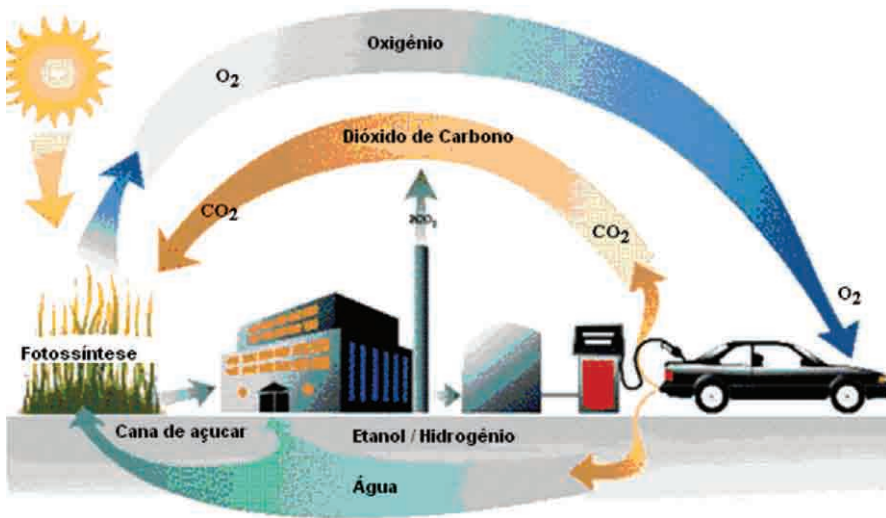


Figura 17.10 – Ciclo do carbono proveniente da cana-de-açúcar

Fonte: Ball State University (2008)

## Conclusões

A reforma a vapor do etanol consiste em uma importante rota para a obtenção de hidrogênio combustível. Esse pode ser utilizado para gerar eletricidade em células a combustível como insumo energético alternativo quando produzido a partir de uma fonte de origem renovável (cana-de-açúcar). O desenvolvimento dessa tecnologia também contribui para o aumento da geração distribuída e descentralizada de energia e para a diminuição das emissões de poluentes ao meio ambiente.

Os resultados experimentais obtidos no protótipo reformador indicaram uma alta concentração de hidrogênio, 75,24%, resultando em uma

proporção igual a 0,7961 L de etanol para cada 1 Nm<sup>3</sup>/h de hidrogênio. Após a passagem do gás de síntese no sistema de purificação por adsorção molecular PSA (*Pressure Swing Adsorption*), observou-se um fluxo de gás rico em hidrogênio, isto é, 99,84 % de H<sub>2</sub>, e baixas concentrações de CO, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

O fluxo do gás de síntese rico em H<sub>2</sub> obtido após o sistema de purificação corroborou para a viabilidade técnica do protótipo de reforma a vapor de etanol.

A análise econômica mostrou que os custos de produção do hidrogênio diminuem com o aumento do período de amortização do capital, com a diminuição da taxa anual de juros e com o aumento do período equivalente de utilização.

Os resultados mostram que o custo do hidrogênio produzido quando se utiliza o bagaço de cana como fonte de calor para o sistema de reforma é, aproximadamente, 10% menor do que o custo do hidrogênio produzido com o sistema operando com eletricidade. Verificou-se que o custo do hidrogênio produzido diminui com o aumento da capacidade de produção, sendo mais significativo esse valor para reformadores de etanol com capacidades de produção acima de 100 Nm<sup>3</sup>/h de hidrogênio.

Os cálculos do dióxido de carbono equivalente [(CO<sub>2</sub>)<sub>e</sub>] e do indicador de poluição (Π<sub>g</sub>) para o sistema de reforma a vapor de etanol utilizando bagaço de cana como fonte de calor possibilitaram a determinação da eficiência ecológica do processo de produção de hidrogênio por reforma a vapor de etanol.

Os resultados mostram que o processo de produção de hidrogênio por reforma a vapor de etanol é uma rota tecnológica ambientalmente promissora, pois apresenta alta eficiência ecológica, 97,82%, quando se considera o ciclo do CO<sub>2</sub>.

No cenário da incorporação do processo de produção de hidrogênio no setor sucroalcooleiro, foi realizado um estudo de caso, no qual se utilizaram 5% do etanol anidro produzido em uma usina típica para a produção de hidrogênio. Os resultados mostram que para 484 L/h de etanol utilizado, tem-se uma produção de hidrogênio na faixa de 608 Nm<sup>3</sup>/h, que pode ser agregada ao setor, com grande potencial energético, ambiental e mercadológico para o hidrogênio.



Finalmente, conclui-se que a investigação dos aspectos técnicos (sistema de reforma, protótipos de reformadores), a análise econômica (custo de produção de hidrogênio, em US\$/kWh) e avaliação dos aspectos ecológicos envolvidos na produção de hidrogênio (processo de reforma a vapor de etanol) contribuem para o desenvolvimento da tecnologia do hidrogênio combustível e possibilitam a abordagem sobre a inovação da cadeia produtiva do etanol.

## **Determinação da eficiência ecológica em um motor de combustão interna aeronáutico usando etanol e gasolina de aviação como combustível**

Um dos grandes motivadores para o estudo de combustíveis alternativos é a crescente preocupação com as consequências do aquecimento global que vem alterando as condições climáticas na Terra. A cada dia, mais e mais pessoas estão trabalhando para reduzir a emissão de poluentes, na tentativa de reverter a atual situação mundial. A ciência vem buscando incessantemente fontes de energia renováveis mais “limpas”, isto é, com menores taxas de emissões de poluentes.

O etanol é produzido a partir de fontes naturais, tais como a cana-de-açúcar no Brasil e o milho nos Estados Unidos. Ele tem sido usado como combustível para carros no Brasil desde 1977. Em outubro de 2004, a primeira aeronave equipada com um motor Lycoming convertido para etanol obteve certificação. Contudo, até agora, não há nenhuma aeronave bicom combustível no mundo. Este trabalho apresenta uma proposta de investigação experimental das características de desempenho para motores de combustão interna aeronáutico usando álcool e gasolina e propõe uma investigação futura para misturas álcool-gasolina de aviação. O intuito é reduzir os custos operacionais da aviação e os danos ao meio ambiente.

Quando ocorre a combustão de combustíveis com carbono ocorre a produção de  $\text{CO}_2$  em quantidades proporcionais ao combustível queimado. Se o combustível for fóssil, o dióxido de carbono liberado na queima será adicionado à atmosfera contribuindo para o aumento do efeito estufa e produzindo o que é chamado de ciclo de carbono positivo. Por sua vez, se

o combustível for de origem vegetal, como o etanol, por exemplo, o  $\text{CO}_2$  liberado é igual ao usado pelas plantas para a fotossíntese e será reabsorvido tornando o ciclo de carbono nulo, o que evita o aumento do efeito estufa. Além do mais, o etanol produz menos CO, HC e  $\text{NO}_x$  do que a gasolina de aviação, quando queimado. O etanol não produz chama de detonação por causa de sua alta octanagem, o que aumenta a eficiência do motor, visto que é possível aumentarem-se as taxas de compressão no interior do cilindro, injetando-se mais combustível e aumentando a potência de saída (Pontoppidan et al., 2006).

Neste trabalho foi utilizado um motor Lycoming IO-540 convertido, que é capaz de operar tanto com álcool quanto com combustível, mantendo a mesma configuração. Deve-se salientar que a capacidade de operar aeronaves militares com bicomcombustível apresenta um aspecto estratégico muito importante, pois aumenta a autonomia do país em relação à defesa nacional. Este trabalho dá suporte às pesquisas de desenvolvimento do motor bicomcombustível, tanto no aspecto de desempenho quanto no de eficiência ecológica.

## Características do motor de combustão interna

A série de motores Lycoming IO-540 possui seis cilindros horizontalmente opostos, com acionamento direto da hélice, sem redução, refrigerados a ar. Os cilindros são de fabricação convencional com cabeças feitas de liga de alumínio fundido e uma câmara de combustão completa. A Tabela 17.12 apresenta as características do motor.

Tabela 17.12 – Características do motor (Lycoming Engines, 2007)

Tipo	4 tempos, ignição por centelha
Número de cilindros	6 opostos
Taxa de compressão	8,7:1
Curso do pistão (polegadas)	4,375
Diâmetro do cilindro (polegadas)	5,125
Deslocamento volumétrico (polegadas cúbicas)	541
Potência nominal	300hp $\cong$ 2.700rpm

A ideia inicial é manter as características mecânicas do motor. Isso significa utilizar a mesma configuração original incluindo a taxa de compressão. Para auxiliar a partida do motor com etanol em dias frios é utilizado o mesmo conceito dos automóveis, ou seja, um pequeno tanque de gasolina para iniciar o processo.

## Descrição do experimento

A bancada de testes para motores aeronáuticos a pistão é apresentada na Figura 17.11. Essa bancada possui um motor Lycoming IO-540-K1D5, idêntico ao que equipa a aeronave NEIVA T-25 'UNIVERSAL', de dotação da Força Aérea Brasileira.



Figura 17.11 – Visão geral da bancada de testes com motor Lycoming IO-540 (IAE).

Nessa bancada são efetuadas várias medições por meio de sistemas diversos, com o armazenamento imediato das informações no banco de dados eletrônico, permitindo assim a posterior análise do funcionamento do motor, por intermédio do aplicativo FieldChart. Entre essas medições estão:

- as temperaturas nas cabeças e dos gases de exaustão (de escapamento) de cada um dos cilindros;
- a vazão de combustível;

- as temperaturas e as pressões do ar de admissão e do óleo;
- a temperatura e as pressões do combustível;
- a rotação do motor;
- a pressão atmosférica.

A experiência consistiu nas medidas de emissões de poluentes e dos parâmetros de desempenho do motor em pontos definidos previamente, sob determinadas condições de rotação e fração da mistura ar-combustível. Para cada condição também foram medidos o torque com o medidor de torque da Lebow, modelo 7541. A emissão de gases foi medida com o analisador de gases Eurotron Greenline 8000.

Os pontos de medição da temperatura foram: cabeça do cilindro, óleo, combustível e escapamento. Além desses parâmetros, também foram medidos o fluxo de combustível, a pressão do óleo, a pressão do combustível e a pressão de admissão. Os parâmetros de desempenho foram constantemente adquiridos ao longo do experimento por meio de um sistema de aquisição de dados.

O conjunto de dados obtidos permite uma abordagem e análise bastante ampla. É possível, portanto, detalhar várias características do motor. Dada a partida no motor, aguardaram-se alguns minutos para o seu aquecimento e correto funcionamento do seu sistema de lubrificação. Após isso, o experimento foi realizado seguindo as etapas:

- com o comando da mistura em RICA (posição máxima), selecionou-se a rotação de 2.700 rpm por meio do comando da válvula de entrada de ar. A partir de então, foi-se empobrecendo de 10% em 10% a mistura por meio de seu comando de combustível e os dados foram sendo adquiridos;
- o procedimento foi repetido para as rotações de 1.800 rpm, 2.000 rpm, 2.200 rpm, 2.400 rpm, 2.600 rpm e 2.700 rpm;
- esse procedimento foi realizado para a condição de 100% de gasolina e 100% de etanol.

## **Análises preliminares de desempenho**

Para melhor visualização e análise, os resultados são apresentados em gráficos, mostrando rotação, consumo de combustível, temperatura de ca-

beça de cilindro e temperatura de escapamento, em razão da pressão de admissão. Também é apresentado o gráfico de potência em razão da rotação que foi obtida por meio da medição do torque (ver Gráficos 17.8 a 17.12).

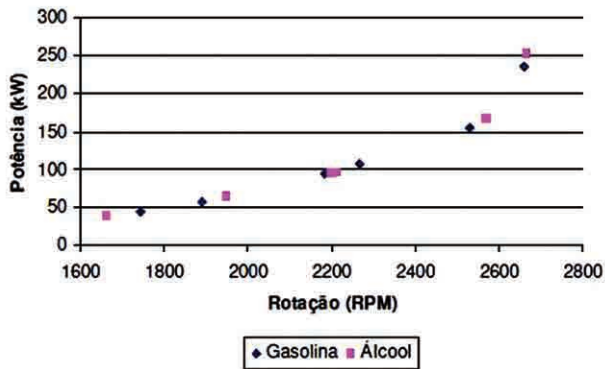


Gráfico 17.8 – Potência *versus* rotação.

No Gráfico 17.8 é possível observar que o etanol fornece uma potência ligeiramente superior à da gasolina. Já o Gráfico 17.9 mostra as curvas de consumo dos dois combustíveis em razão da pressão de admissão, de onde se observa um maior consumo do etanol em comparação com a gasolina.

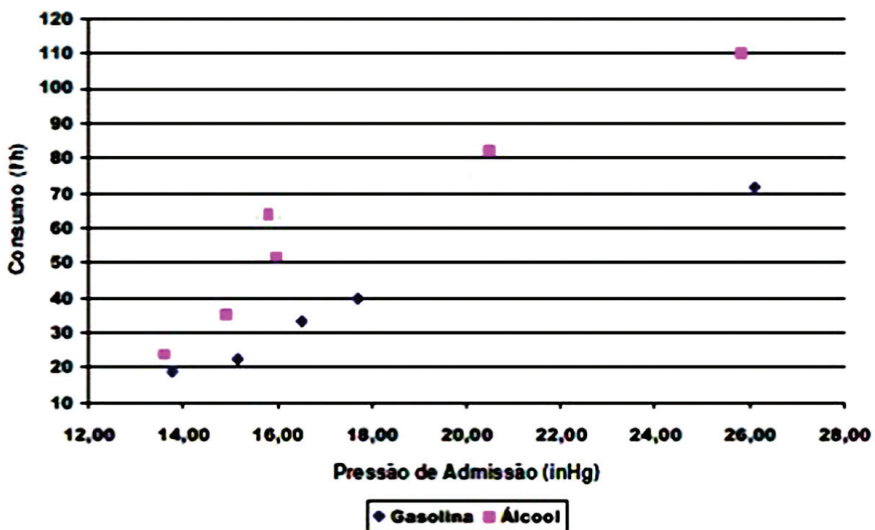


Gráfico 17.9 – Consumo de combustível *versus* pressão de admissão.

Apesar de o etanol, por unidade de massa ou volume, ter poder calorífico bem inferior ao da gasolina, cerca de 40% menor, quando se considera a razão estequiométrica da combustão tem-se que o poder calorífico da mistura ar-etanol é apenas 10% inferior ao da mistura ar-gasolina, o que já diminui a diferença. Além disso, ao misturar com o ar e evaporar, o etanol retira o dobro da quantidade de calor do ar do que é retirado pela gasolina, e isso aumenta a densidade do ar que entra no cilindro. Como a potência de um motor é proporcional à quantidade de ar que se pode pôr dentro do cilindro e o etanol queima mais lentamente no interior do cilindro do que a gasolina, o que aumenta o tempo em que a pressão da combustão atua sobre o pistão, o motor a etanol acaba por fornecer mais potência que o motor a gasolina. Como o etanol fornece potência maior, o rendimento do etanol é maior ainda em relação à gasolina.

O Gráfico 17.10 mostra as temperaturas de cabeça do cilindro mais crítico (maior grau de aquecimento), no caso o cilindro 5; por ele nota-se que o motor opera bem mais frio quando opera com álcool, pelo menos 40°C.

Esse fato indica que o etanol provoca menor estresse térmico no motor do que a gasolina.

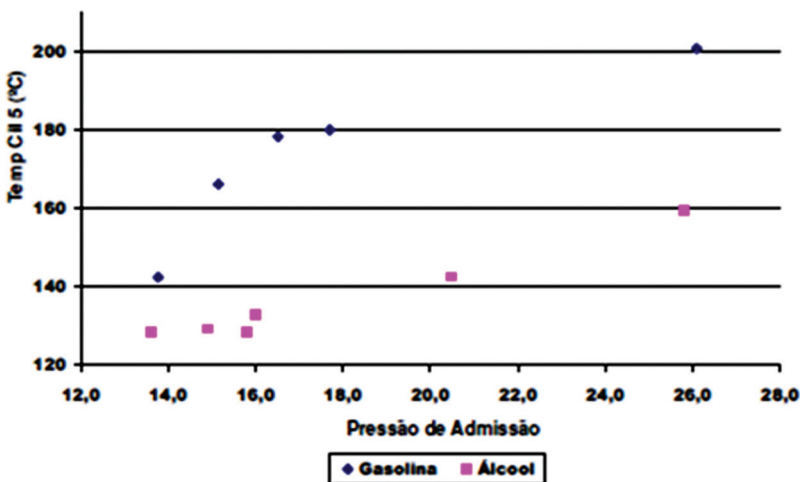


Gráfico 17.10 – Temperatura na cabeça do cilindro *versus* pressão de admissão.

No Gráfico 17.11 são apresentadas as temperaturas do escapamento do cilindro mais crítico (cilindro 5). Observa-se que o álcool provoca menor estresse térmico no motor, do que a gasolina.

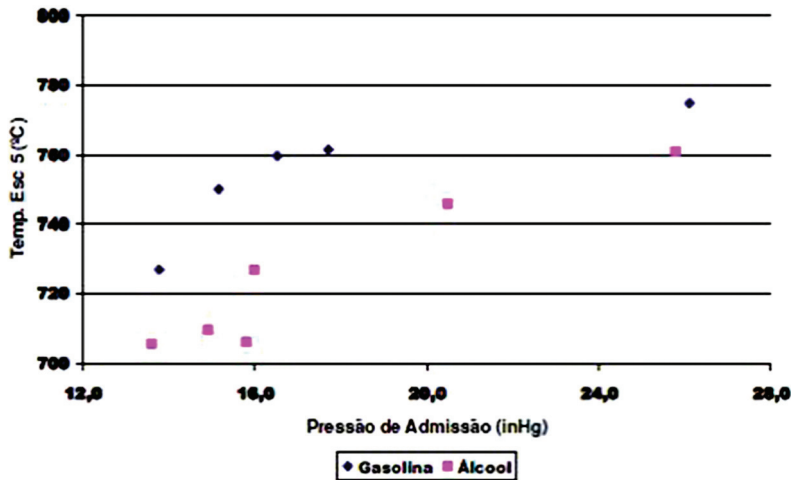


Gráfico 17.11 – Temperatura de escapamento *versus* pressão de admissão.

Durante essa etapa, para cada determinada posição da borboleta (isto é, para cada diferente vazão de ar) foi ajustada a entrada de combustível, variando desde mistura rica, com excesso de combustível, passando pela estequiométrica, até a mistura pobre. Observou-se em todas as situações analisadas que o ponto de relação estequiométrica é caracterizado por um aumento súbito, porém sutil, na rotação e no torque. O Gráfico 17.12 ilustra essa condição.

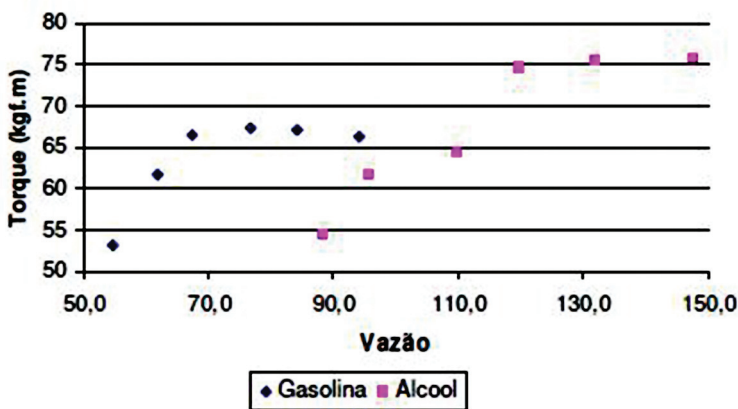


Gráfico 17.12 – Vazão *versus* torque e potência (2.700 rpm).

## Eficiência ecológica

Em 1999, Cardu e Baica (1999a) introduziram o conceito de dióxido de carbono equivalente [(CO<sub>2</sub>)<sub>e</sub>]. Baseando-se na concentração máxima permitida para o CO<sub>2</sub>, que é 10.000 mg/m<sup>3</sup>, determinam-se os coeficientes equivalentes para alguns poluentes. As concentrações máximas admissíveis para alguns gases nocivos na atmosfera de um ambiente de trabalho são apresentadas na Tabela 17.13.

Tabela 17.13 – Concentração máxima admissível para gases no ambiente de trabalho

Gás	Concentração média (mg/m <sup>3</sup> )	Máxima concentração admissível (mg/m <sup>3</sup> )
CO <sub>2</sub>	7.000	10.000
SO <sub>2</sub>	10	15
NO <sub>x</sub>	0	10

A World Health Organization (Villela, 2007) apresenta valores específicos para concentração máxima admitida para exposição de uma hora, conforme apresentado na Tabela 17.14.

Tabela 17.14 – Padrões de qualidade do para uma hora

Gás	concentração máxima para 1h (mg/m <sup>3</sup> )
SO <sub>2</sub>	125
NO <sub>x</sub>	200

O limite de materiais particulados emitidos por um processo de combustão é especificado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama), por meio de sua Resolução n° 3, de 28 de junho de 1990. Essa resolução considera para padrões secundários de qualidade do ar uma concentração média de 24 horas de 150 mg/m<sup>3</sup> de materiais particulados, que não deve ser excedida mais de uma vez no ano (Brasil, 2007).

Para o cálculo do coeficiente de dióxido de carbono equivalente, divide-se a máxima concentração de CO<sub>2</sub> permitida pelo padrão de qualidade de ar prevista pelo WHO para NO<sub>x</sub>, SO<sub>2</sub> e MP em uma hora (Villela, 2007).



A expressão para  $(\text{CO}_2)_e$  é ilustrada pela Equação (17.22) (Cardu; Baica, 1999a).

$$(\text{CO}_2)_e = (\text{CO}_2) + 80 \cdot (\text{SO}_2) + 50 \cdot (\text{NO}_x) + 67 \cdot (\text{MP}) \quad (17.22)$$

Na Equação (17.22),  $(\text{SO}_2)_e = 80(\text{SO}_2)$  é o dióxido de enxofre equivalente em  $(\text{CO}_2)$ ,  $(\text{NO}_x)_e = 50(\text{NO}_x)$ , é o dióxido de nitrogênio equivalente em  $(\text{CO}_2)$  e o material particulado equivalente em  $(\text{CO}_2)$  é  $(\text{MP})_e = 67(\text{PM})$ . O melhor combustível do ponto de vista ecológico é o que apresenta um quantidade mínima de dióxido de carbono equivalente  $(\text{CO}_2)_e$  proveniente da combustão. Para quantificar o impacto ambiental, Cardu e Baica (1999a) propõem um indicador, definido como a diferença entre o dióxido de carbono equivalente do combustível e seu poder calorífico inferior (PCI). A esse indicador deu-se o nome de “indicador de poluição”, representado por  $\Pi_g$ , Equação (17.23).

$$\Pi_g = \frac{(\text{CO}_2)_e}{Q_i} \quad (17.23)$$

onde:

- $(\text{CO}_2)_e$  – dióxido de carbono equivalente ( $\text{kg}/\text{kg}_{\text{comb}}$ );
- PCI – poder calorífico inferior do combustível ( $\text{MJ}/\text{kg}_{\text{comb}}$ );
- $\Pi_g$  – indicador de poluição ( $\text{kg}/\text{MJ}$ ).

A eficiência ecológica ( $\varepsilon$ ) é um indicador adimensional que permite avaliar o impacto ambiental das emissões gasosas de uma planta termoelétrica, mediante uma comparação entre emissões poluentes integradas hipoteticamente (emissões equivalentes de  $\text{CO}_2$ ) com os padrões existentes de qualidade do ar. Considera-se também a eficiência de conversão como um fator determinante sobre as emissões específicas, expresso por um número fracionário, Equação (17.24) (Cardu; Baica, 1999a)

$$\varepsilon = \left[ \frac{0,204 \cdot \eta}{\eta + \Pi_g} \cdot \ln(135 - \Pi_g) \right]^{0,5} \quad (17.24)$$

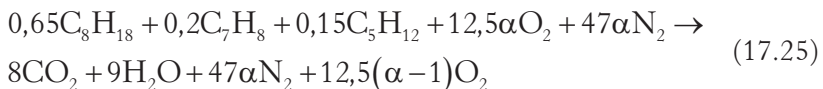
onde  $\varepsilon$  integra em um só coeficiente os aspectos que definem a intensidade do impacto ambiental de uma unidade termelétrica: a composição do com-

bustível, a tecnologia de combustão, o indicador de poluição e a eficiência de conversão. O valor de  $\varepsilon$  varia (entre 0 e 1), é diretamente proporcional ao valor do indicador de poluição ( $\Pi_g$ ). Do ponto de vista ecológico, um valor mínimo admissível para a eficiência ecológica seria igual a 0,5 que seria chamado “valor crítico de eficiência ecológica”, e o valor  $\varepsilon = 0$  considera-se situação insatisfatória (muito poluidor), mas  $\varepsilon = 1$  indica uma situação ideal (poluição zero) (Villela, 2007).

## Gasolina e etanol

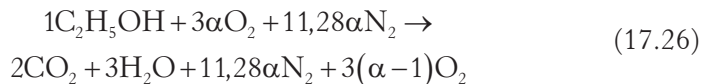
A gasolina é um combustível constituído basicamente por hidrocarbonetos. Esses hidrocarbonetos são, em geral, menos pesados que aqueles pertencentes ao diesel (normalmente têm de 5 a 8 moléculas de carbono). Além dos hidrocarbonetos, a gasolina contém compostos metálicos, tais como o chumbo tetraetila e o dibrometo de etileno (Petrobras, 2007).

A fórmula química da gasolina de aviação usada neste trabalho é de aproximadamente 65% de iso-octano, 20% de iso-pentano e 15% de tolueno; com densidade de 740 kg/m<sup>3</sup> (Brasil, 2006). A Equação (17.25) é normalizada para excesso de ar ( $\alpha$ ).



Adotando-se que a gasolina seja queimada na mistura com 30% de excesso de ar, depois do balanço estequiométrico a percentagem em massa de cada componente resultante da reação é: 15,48 % CO<sub>2</sub>; 6,51 % H<sub>2</sub>O; 72,90 % N<sub>2</sub> e 5,11 % O<sub>2</sub>.

A fórmula química do etanol etílico é C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH e sua densidade é de 790 kg/m<sup>3</sup>, para sua reação de combustão estequiométrica o resultado é: 88 gCO<sub>2</sub> para 46 g etanol, conseqüentemente: 1.511 t de CO<sub>2</sub> por m<sup>3</sup> de etanol.



Adotando-se que o etanol seja queimado na mistura com 30% de excesso de ar, depois do balanço estequiométrico a percentagem em massa de cada

componente resultante da reação é: 15,14 % CO<sub>2</sub>; 9,29 % H<sub>2</sub>O, 70,62 % N<sub>2</sub> e 4,95 % O<sub>2</sub>.

## Toxicidade em motores de combustão interna usando gasolina e etanol

As substâncias que compõem os gases de exaustão podem ser classificadas em vários grupos: nitrogênicos, oxigênicos, hidrogênicos, vapor e dióxido de carbono, pertencentes ao grupo não tóxico; e monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>), hidrocarbonetos (CxHy), aldeídos (RxCHO), fuligem, dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), ácido sulfúrico e material particulado, pertencentes ao grupo tóxico. Os hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) são substâncias cancerígenas e formam um grupo especial (Lizarraga, 1994).

Em geral, quando 1 kg de gasolina é queimado, libera-se de 300 g a 310 g de componentes tóxicos, especificamente: 225 g de CO; 55 g de NO<sub>x</sub>; 20 g de HC; 1,5 g a 2 g de SO; 0,8 g a 1 g de aldeídos; 1 g a 1,5 g de fuligem (Patrakhaltsev et al., 1993). O MP emitido por motores de combustão interna a gasolina é 1,44 kg/m<sup>3</sup> (Carvalho Jr.; McQuay, 2007). Em um motor de combustão interna operando com etanol puro elimina-se a emissão de enxofre, o que representa uma vantagem sobre a gasolina. Por sua vez, o uso de etanol gera uma quantidade de material particulado insignificante que é desprezado para efeito de cálculos. Finalmente, as emissões de NO<sub>x</sub>, de acordo com a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (Cetesb), são de aproximadamente 0,8 kg/m<sup>3</sup>.

## Cálculo da eficiência ecológica

A Tabela 17.15 apresenta uma comparação teórica entre as emissões da gasolina e do etanol quando utilizados em um motor de combustão interna. O Gráfico 17.13 apresenta os valores da eficiência ecológica calculados para os dois combustíveis analisados e, finalmente, no Gráfico 17.14, são apresentados os valores da eficiência ecológica em razão do desempenho do motor.

Tabela 17.15 – Comparação dos resultados teóricos de emissões de poluentes entre os combustíveis analisados em motores de combustão interna

Emissão de poluente (kg/kg de comb)	Gasolina de aviação	Etanol	Gasolina/etanol
(CO <sub>2</sub> ) <sub>e</sub>	6,1710	1,9688	3,13 vezes
MP	1,945.10 <sup>-3</sup>	–	–
NO <sub>x</sub>	55.10 <sup>-3</sup>	1,1163.10 <sup>-3</sup>	49,27 vezes
SO <sub>2</sub>	2.10 <sup>-3</sup>	–	–
CO <sub>2</sub>	3,1306	1,9130	1,63 vez
Total (kg/kg de combustível)	3,1876	1,9141	1,66 vez
Eficiência ecológica (%)	82,43	89,51	–

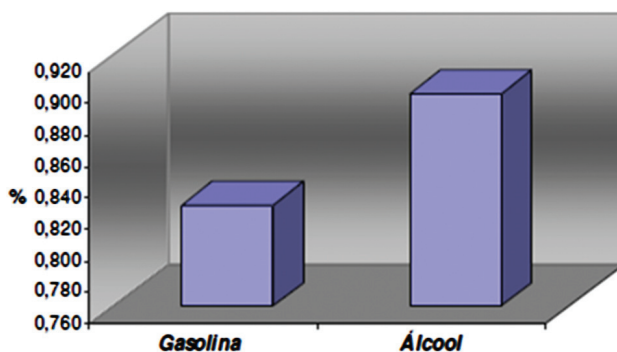


Gráfico 17.13 – Eficiência ecológica da gasolina e do etanol (álcool).

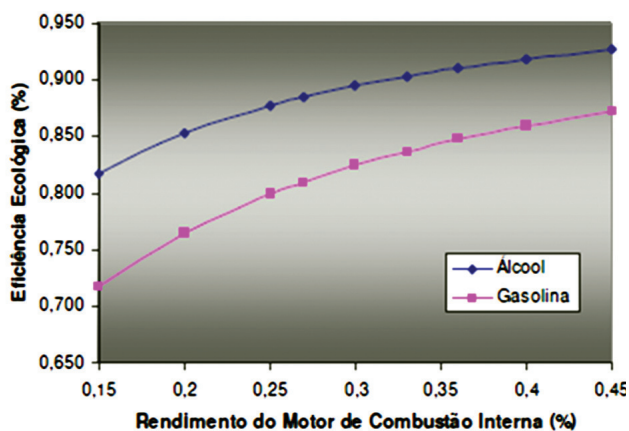


Gráfico 17.14 – Variação da eficiência ecológica em razão do desempenho do motor de combustão interna.

A Tabela 17.16 apresenta a comparação de emissões de poluentes de motores de combustão interna utilizando diferentes combustíveis.

Tabela 17.16 – Comparação dos resultados de emissões de poluentes entre os combustíveis analisados em motores de combustão interna (Coronado-Rodríguez et al., 2009)

Emissão de poluente (kg/kg de comb)	Gás natural	Diesel	Gasolina <sup>(*)</sup>	Biodiesel B20	Biodiesel B100	Diesel/B100
(CO <sub>2</sub> ) <sub>e</sub>	2,727	8,529	5,891	7,502	3,423	2,5
MP	1,71.10 <sup>-5</sup>	15,27.10 <sup>-3</sup>	1,92.10 <sup>-3</sup>	14,21.10 <sup>-3</sup>	9,931.10 <sup>-3</sup>	1,5
NO <sub>x</sub>	4,41.10 <sup>-4</sup>	4.10 <sup>-2</sup>	5,5.10 <sup>-2</sup>	4,04.10 <sup>-2</sup>	4,2.10 <sup>-2</sup>	0,9
SO <sub>2</sub>	1,21.10 <sup>-6</sup>	3.10 <sup>-2</sup>	2.10 <sup>-3</sup>	2,4.10 <sup>-2</sup>	–	–
CO <sub>2</sub>	2,704	3,106	2,853	2,61	0,658	4,7
Total (kg/kg de combustível)	2,7042	3,161	2,912	2,689	0,71	4,4
Eficiência ecológica (%)	91,95	77,34	85,52	78,94	87,58	–

(\*) Gasolina com 20% de etanol.

Comparando-se o etanol com a Tabela 17.16 observa-se que o motor apresenta uma eficiência ecológica excelente (89,51%), ficando abaixo somente do gás natural. É importante salientar que a eficiência ecológica calculada não considera o ciclo de carbono do etanol, o que significa que seu valor é maior do que o apresentado.

## Influência da mistura na emissão de poluentes

Esta parte do trabalho avaliou a influência da relação ar/combustível quanto à emissão de poluentes. O experimento foi realizado iniciando em 1.800 rpm com mistura totalmente rica (100%) e, a partir daí, essa foi sendo empobrecida até que o motor começasse a apresentar falhas. Esse procedimento foi repetido para 2.000 rpm, 2.200 rpm, 2.400 rpm, 2.600 rpm e 2.700 rpm.

As emissões de CO<sub>2</sub> são dadas em porcentagem de volume, e as de CO e NO<sub>x</sub>, em ppm.

Nos Gráficos 17.15, 17.16 e 17.17 são apresentados CO, CO<sub>2</sub> e NO<sub>x</sub>, respectivamente, para a rotação de 2.000 rpm.

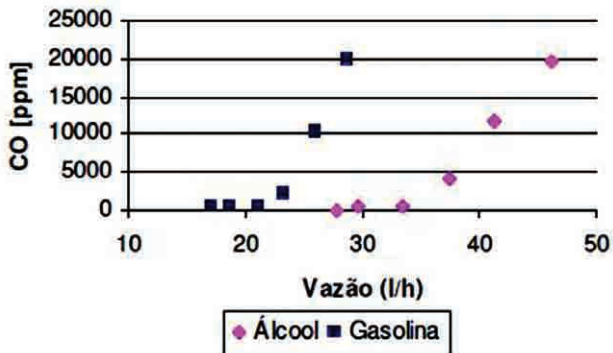
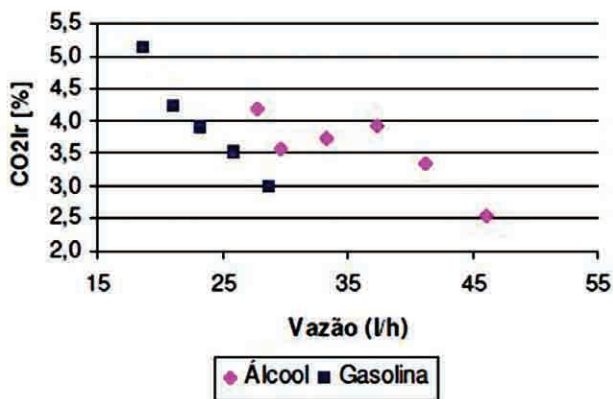
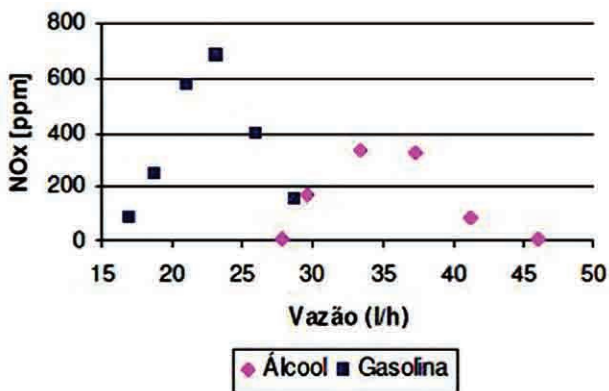


Gráfico 17.15 – Emissão de CO para 2.000 rpm.

Gráfico 17.16 – Emissão de CO<sub>2</sub> para 2.000 rpm.Gráfico 17.17 – Variação de NO<sub>x</sub> para 2.000 rpm.

Observa-se que o CO é diretamente proporcional a uma reação com mais combustível e que o CO<sub>2</sub> é inversamente proporcional. Essa conclusão é coerente, pois uma reação com excesso de ar gera mais CO<sub>2</sub> do que uma com falta de ar. A geração de CO e de CO<sub>2</sub> apresentam curvas com derivada contrária.

Quanto ao NO<sub>x</sub>, sua emissão é diretamente proporcional à temperatura na câmara de combustão.

## Conclusões

Os estudos preliminares mostraram que há muitas vantagens em se utilizar álcool como combustível em motores de combustão interna. Essas vantagens suportam as pesquisas com os motores aeronáuticos bicomcombustíveis. Elas são:

- os motores podem operar em temperaturas mais baixas que os seus limites, o que reduz o desgaste das cabeças de cilindro. A temperatura na cabeça de cilindro é um parâmetro crítico para esse tipo de motor;
- o álcool produz menos emissões de poluentes e, conseqüentemente, agride menos o meio ambiente;
- em termos de eficiência ecológica, de acordo com os combustíveis analisados, para gasolina e álcool os valores são, respectivamente, 82,43% e 89,51%.

Os estudos mostram que o álcool pode ser utilizado como uma alternativa de combustível do ponto de vista ecológico, uma vez que tem maior eficiência ecológica que a gasolina.

Este trabalho faz parte do programa de pesquisa e desenvolvimento motor de combustão interna aeronáutico bicomcombustível brasileiro e suportará a tomada de decisões no estudo de viabilidade econômica e ambiental do mesmo.

## Referências bibliográficas

AINCHE, T. *Steam reforming of methane and bio-ethanol*: post-graduate course bio-energy – theory & applications. Helsinki: Department of Energy Technology,

- Fraunhofer Institute for Solar Energy Systems (ISE), Helsinki University of Technology – HUT, 2005. p.18-19.
- BALL STATE UNIVERSITY. *Ciclo do carbono*. Disponível em: <<http://arreffett.iweb.bsu.edu/ethanol.htm>>. Acesso em: 8 jul. 2008.
- BARTHEL, L. P. et al. *Cost analysis of hydrogen infrastructure in Europe*. Stuttgart: IKP – University of Stuttgart, Department for Life Cycle, Engineering, 2004. 17p.
- BOEHM, F. R. *Design analysis of thermal systems*. New York: John Wiley & Sons, 1987. 173p.
- BRAGA, L. B. *Análise econômica do uso de célula a combustível para acionamento de ônibus urbano*. Guaratinguetá, 2010. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- BRASIL – MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA. Balanço Energético Nacional: resumo executivo. Rio de Janeiro, RJ: MME, 2006.
- BRASIL – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução Conama nº 3. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res90/res0390.html>>. Acessado em: Abril de 2007.
- CAMARGO, J. R. et al. Thermoeconomic analysis of an evaporative desiccant air conditioning system. *Applied Thermal Engineering*, v.23, p.1537-49, 2003.
- CARDU, M.; BAICA, M. Regarding a global methodology to estimate the energy: ecologic efficiency of thermopower plants. *Energy Conversion and Management*, v.40, p.71-87, 1999.
- CARVALHO JUNIOR, J. A.; MCQUAY, M. Q. *Princípios de combustão aplicada*. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 176p.
- CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS – CGEE. *Hidrogênio energético no Brasil: subsídios para políticas de competitividade, 2010-2025; Tecnologias críticas e sensíveis em setores prioritários*. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010. 68p. (Série Documentos Técnicos, v.7).
- CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA – CTC. Poder calorífico inferior. Disponível em: <<http://www.ctcanavieira.com>>. Acesso em: 4 nov. 2010.
- CIAMBELLI, P. et al. Platinum catalysts for the low temperature catalytic steam reforming of ethanol. *Aidic Conference Series*, v.9, p.83-92, ACOS0909011, 2009.
- CORONADO-RODRIGUEZ, C. J. et al. Determination of ecological efficiency in internal combustion engines: the use of biodiesel. *Applied Thermal Engineering*, v.29, p.1887-92, 2009.
- KOTHARIR, R. et al. Comparison of environmental and economic aspects of various hydrogen production methods. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.12, p.553-63, 2008.
- LIZARRAGA, J. M. S. *Cogeneración: aspectos termodinámicos, tecnológicos y económicos*. Bilbao, ES: Edit. Universidad del País Vasco, 1994.
- LORA, E. E. S.; NASCIMENTO, M. A. R. Geração termelétrica: planejamento, projeto e operação. *Interciência*, Rio de Janeiro, v.1, p.631, 2004.



- LYCOMING ENGINES. Lycoming IO-540 data sheet. Disponível em: <<http://www.lycoming.textron.com/engines/series/540-series-engines.jsp>>. Acesso em: abril de 2007.
- MARTINELLI JUNIOR, L. C. *Sistema de ar condicionado por absorção para ônibus*. Guaratinguetá, 2008. 192f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- NOGUEIRA, L. A. H. *Biocombustíveis líquidos*. Nota técnica para a União da Indústria de Cana-de-açúcar. Itajubá: Instituto de Recursos Naturais, Universidade Federal de Itajubá – Unifei, set. 2009.
- O CICLO DO ETANOL. Disponível em: <<http://lh3.ggpht.com/mooonte/SChUyz8LucI/AAAAAAAAAiw/K8yS4qLq92w/etanol.jpg>>. Acesso em: 9 jul. 2008.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. *Economic assessment of biofuel support policies*, 2008. Disponível em: <<http://www.wilsoncenter.org>>. Acesso em: 19 jun. 2009.
- PETROBRAS – Petróleo do Brasil S/A. Ecological efficiency [online]. 2007. Disponível em: <<http://www2.petrobras.com.br>>. Acesso em: 1º ago. 2007.
- PONTOPIDDAN, M. et al. Description of preliminary study for technology transfer of an ethanol mixture preparation system from automotive application to a 4-cylinder 5.9 liter aircraft engine. *SAE-Brazil Paper* 2006-01- 2878, 2006.
- RENEWABLE FUELS ASSOCIATION – RFA. *Federal regulations: renewable fuels standard*. 2009. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/>>. Acesso em: 21 ago. 2009.
- SALES, C. A. V. B. *Avaliação técnico econômica da conversão da biomassa em eletricidade utilizando tecnologias de gaseificação*. Itajubá, 2007. 188f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Energia) – Universidade Federal de Itajubá.
- SILVA, M. E. *Análise termoquímica de reformador de etanol: produção de hidrogênio para acionamento de uma célula a combustível do tipo PEM de 1kW*. Guaratinguetá, 2005. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- SILVA, M. E. et al. Produção de hidrogênio a partir da reforma a vapor do etanol para aplicação em célula a combustível do tipo PEM. In: EIGHTH LATIN-AMERICAN CONGRESS ON ELECTRICITY GENERATION AND TRANSMISSION. *Proceedings of CLAGTEE2009*. Ubatuba/SP, 2009. 6p.
- SILVA, R. E. P. *Utilização de biodiesel animal em turbinas a gás*. 2009. 154f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade Engenharia de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Guaratinguetá, 2009.
- SILVEIRA, J. L. et al. The benefits of ethanol use for hydrogen production in urban transportation. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v.13, p. 2525-34, 2009.
- \_\_\_\_\_. *Produção de hidrogênio através da reforma a vapor de etanol (início: 2003; conclusão: 2006)*. Construção de protótipos e relatórios científicos: projeto de P&D ANEEL / Cemig-Unesp n.108, 2006.

- \_\_\_\_\_. Thermodynamic analysis of direct steam reforming of ethanol in molten carbonate fuel cell. *Journal of Fuel Cell Science and Technology*, v.5; id. 021012-1-6, 2008.
- SISTEMA DE APOIO À DECISÃO – SAD/ANEEL. Disponível em: <<http://rad.aneel.gov.br/>>. Acesso em: 8 nov. 2010.
- SOUZA, A. C. C. *Análise técnica e econômica de um reformador de etanol para produção de hidrogênio*. Guaratinguetá, 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- SOUZA, A. C. C. et al. Physical-chemical and thermodynamic analyses of ethanol steam reforming for hydrogen production. *Journal of Fuel Cell Science and Technology*, v.3, n.3, p.346-50, 2006.
- SOUZA, E. L.; MACEDO, I. C. *Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética*. São Paulo: Luc Projetos de Comunicação, 2010.
- SOUZA, E. L. et al. *Internacionalização fusão e aquisição no setor sucroenergético brasileiro*: Unica. Sober 2010. Campo Grande – MS, 2010. p.1-32.
- SOUZA, Z.; AZEVEDO, P. Energia elétrica excedente no setor sucroalcooleiro: um estudo a partir de usinas paulistas. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, Brasília, 2006.
- TOLMASQUIM M. T. (Org.) *Fontes renováveis de energia no Brasil*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- U. S. DEPARTMENT OF ENERGY. *Energy efficiency and renewable energy: energy information portal*, 2010. Disponível em: <<http://www.eere.energy.gov/>>. Acesso em: 10 maio 2010.
- UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. *Produção de cana-de-açúcar para indústria sucroalcooleira nos principais Estados do Brasil*. Unica, 2010. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 28 jul. 2010.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. *EPA proposes new regulations for the national renewable fuel standard program for 2010 and beyond*. 2009. Disponível em: <<http://www.epa.gov/otaq/renewablefuels/420f09023.pdf>>. Acesso em: 31 ago. 2009.
- VILLELA, I. A. C. *Desenvolvimento de um modelo termodinâmico que considera os impactos ambientais*. 2007. 145f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Guaratinguetá, 2007.
- VILLELA, I. A. C.; SILVEIRA, J. L. Ecological efficiency in thermoelectric power plants. *Applied Thermal Engineering*, v.27, p.840-7, 2007.



## 18

# Uso de biogás para produção de água gelada e eletricidade

*José Luz Silveira, Wendell de Queiróz Lamas,  
Iraides Aparecida de Castro Villela,  
Giorgio Eugenio Oscare Giacaglia,  
Luiz Octávio Mattos dos Reis*

### **Análise energoeconômica do aproveitamento do biogás gerado na estação de tratamento de efluentes de um laticínio para a produção complementar de água gelada**

Atribui-se o nome de biogás à mistura gasosa, combustível, resultante da fermentação anaeróbica da matéria orgânica; essa mistura é constituída, em volume, por metano ( $\text{CH}_4$ ), com valores médios entre 55% e 65%, e por dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) com aproximadamente 35% a 45% de sua composição. O biogás é obtido a partir da decomposição anaeróbica de lixo urbano, resíduos animais e de lamas provenientes de estações de tratamento de efluentes. Pela presença do metano, é um gás combustível, e seu poder calorífico inferior é aproximadamente  $5.500 \text{ kcal/m}^3$ , quando a proporção em volume de metano é em média 60%.

O grande volume de resíduos provenientes das explorações agrícolas e pecuárias, assim como aqueles produzidos por matadouros, indústrias de laticínios, esgotos domésticos e estações de tratamento de lixos urbanos apresentam uma carga poluente de tal forma elevada, que impõem a criação de soluções que permitam diminuir os danos provocados por essa poluição, procurando gastar o mínimo de energia possível em todo o processo. Assim, o tratamento desses efluentes pode processar-se por intermédio da fermentação anaeróbia que, além da capacidade de despoluir, permite valorizar um produto energético (biogás) e ainda obter um fertilizante cuja

disponibilidade contribui para uma rápida amortização dos custos da tecnologia instalada (Pires, 1996).

Industrialmente, o biogás tem possibilidade de atuar como uma alternativa eficiente e econômica, e entre as atividades mais indicadas à utilização da biodigestão como fonte geradora de combustível têm-se as indústrias de laticínios, as extratoras de óleos vegetais, as usinas de açúcar, as agroindústrias produtoras de alimentos, as criações de aves e suínos, entre outras (Gastaldoni, 1985). O biogás pode ser aproveitado tanto em sua queima direta (aquecedores, fogões, caldeiras etc.) como também para a produção simultânea de energia elétrica e térmica por meio da cogeração.

O objetivo deste trabalho é analisar energética e economicamente a viabilidade do aproveitamento do biogás gerado no reator anaeróbico da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) de um laticínio, que atualmente é queimado e lançado ao meio ambiente. A ideia é utilizar esse biogás como fonte de energia alternativa para a produção complementar de água gelada, destinada à câmara frigorífica da referida indústria.

## Caracterização do sistema de recuperação de calor residual

A Figura 18.1 caracteriza o combustor o qual permite a recuperação de calor residual produzido da queima do biogás na ETE. O combustor deverá possuir uma válvula de ar de modo a manter a temperatura de queima desses gases no máximo a 1.000°C. A vazão desses gases oriundos da combustão acionará o sistema de refrigeração por absorção (SRA) de  $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$ , para produzir água gelada complementar a 1°C, necessária ao processo (Villela et al., 1985).

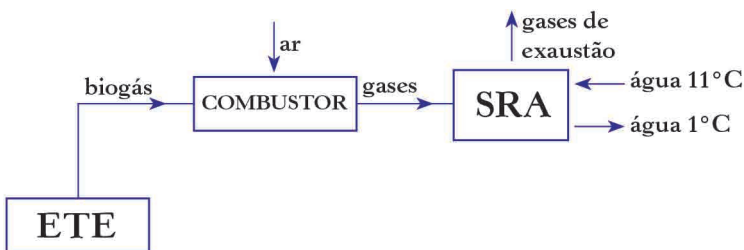


Figura 18.1 – Esquema da instalação proposta.

## Sistema de refrigeração por absorção

### Máquinas de absorção

Máquinas de absorção são equipamentos de produção de frio ou quente que operam com um dos princípios mais primitivos da refrigeração. No ciclo, a água, um fluido secundário, absorve a amônia, um fluido refrigerante primário, o qual é vaporizado. O processo de evaporação absorve calor, suprimindo assim a refrigeração necessária. Geralmente os equipamentos de absorção de amônia e água são usados em grandes aplicações industriais que requerem baixas temperaturas para o processo de resfriamento; nesses ciclos utilizam-se amônia como refrigerante e água como absorvente. O sistema de refrigeração por absorção consiste basicamente em um evaporador, um absorvedor, um condensador, um gerador, um trocador de calor, uma pequena bomba e auxiliares. Na parte inferior do sistema são localizados o absorvedor e o evaporador, ocupando a mesma carcaça, e na parte superior, em outra carcaça estão localizados o gerador e o condensador (Costa, 1976).

### Instalação proposta para a cooperativa de laticínios

A Figura 18.2 apresenta o sistema de refrigeração por absorção proposto para o laticínio, que deverá utilizar a mistura binária de amônia e água. O ciclo de refrigeração proposto pode ser explicado como segue: no gerador ocorrerá a dissociação da amônia, mediante o calor fornecido pelos gases de exaustão, no ponto 20 da Figura 18.2. Essa solução de amônia, dissociada no gerador, será então enviada para o retificador, onde uma pequena fração de água será deslocada para o gerador, no ponto 8 da Figura 18.2. Do retificador, a solução rica de amônia será enviada para o condensador, onde será liquefeita e fluirá para o evaporador. Essa solução será expandida isoentalpicamente (válvula de expansão), acarretando um decréscimo em sua temperatura e pressão. No absorvedor, a solução fraca de amônia proveniente do gerador absorverá o vapor de amônia proveniente do evaporador. Essa mistura será então bombeada para o gerador e o ciclo será restaurado.

Ocorre a produção de água quente através da passagem de água ( $25^{\circ}\text{C}$ ) da rede pelo absorvedor e posteriormente pelo condensador, onde o calor produzido elevará a temperatura ao redor de  $36^{\circ}\text{C}$ .

O objetivo deste trabalho, que é a produção de água gelada, será obtido através da passagem de uma água de retorno do processo a 11 °C pelo evaporador, obtendo-se finalmente água gelada a 1 °C.

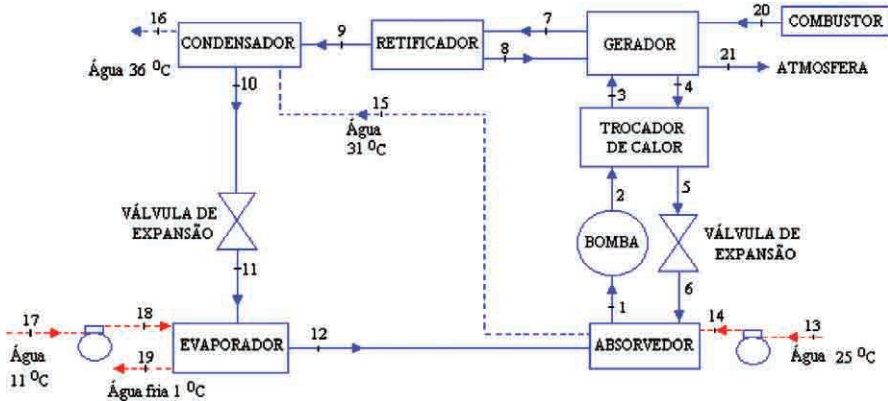


Figura 18.2 – Configuração do sistema de refrigeração por absorção.

A Tabela 18.1 apresenta os parâmetros termodinâmicos do ciclo de absorção referentes à Figura 18.2 (Herold et al., 1996, p.329).

Tabela 18.1 – Dados termodinâmicos do sistema de refrigeração por absorção

PONTOS	P [MPa]	T [°C]	h [kJ/kg]	s [kJ/kgK]	x [kg/kg]
1	0,240	40,000	-42,282	0,474	0,368
2	1,555	40,500	-39,235	0,479	0,368
3	1,555	110,700	306,753	1,465	0,368
4	1,555	131,000	401,628	1,652	0,268
5	1,555	40,500	0,863	0,533	0,268
6	0,204	40,700	0,863	0,537	0,268
7	1,555	108,000	1547,495	4,891	0,944
8	1,555	108,000	264,124	1,354	0,368
9	1,555	44,000	1294,195	4,173	0,999
10	1,555	40,000	190,124	0,659	0,999
11	0,240	-14,500	190,124	0,763	0,999
12	0,240	-10,000	1264,271	5,000	0,999
13	0,150	25,000	105,000	0,367	0,000
14	0,200	25,001	105,050	0,367	0,000
15	0,180	31,000	130,110	0,451	0,000

Continua

Tabela 18.1 – *Continuação*

16	0,160	36,000	150,970	0,520	0,000
17	0,150	11,000	46,340	0,166	0,000
18	0,200	11,001	46,390	0,166	0,000
19	0,180	1,000	4,341	0,015	0,000
20	0,360	970,000	–	–	–
21	0,200	250,000	–	–	–

### Análise energética do sistema de refrigeração por absorção

A análise termodinâmica do sistema de refrigeração por absorção é realizada a partir do balanço energético de sua instalação, o que torna indispensável o conhecimento perfeito do equilíbrio entre o fluido refrigerante adotado e a substância absorvente. As Equações (18.1) a (18.7) mostram os cálculos necessários do ciclo representado na Figura 18.2.

Note-se que o calor no gerador se refere ao entregue pelos gases e é representado pela Equação (18.1)

$$\dot{Q}_g = \dot{Q}_{\text{gases}} = \dot{m}_{\text{gases}} \cdot C_{p_{\text{gases}}} \cdot \Delta T \quad (18.1)$$

De acordo com Petbow (1998), o coeficiente de desempenho (*Coefficient of Performance* – COP) para a produção de frio (em simples estágio) varia entre 0,4 e 1. Neste trabalho utilizou-se um valor para o COP = 0,75. O fluxo de calor do evaporador pode ser determinado pela Equação (18.2).

$$\dot{Q}_e = \text{COP}_f \cdot \dot{Q}_g \quad (18.2)$$

Da equação do balanço de energia, os fluxos de calor do evaporador e do condensador são determinados pelas Equações (18.3) e (18.4).

$$\dot{Q}_e + \dot{m}_{11} \cdot h_{11} = \dot{m}_{12} \cdot h_{12} \quad (18.3)$$

$$\dot{Q}_c + \dot{m}_9 h_9 = \dot{m}_{10} h_{10} \quad (18.4)$$

Os valores de  $C_{p_{ag}} = 4,2026 \text{ kJ/kg.K}$  e  $C_{p_{ag}} = 4,1790 \text{ kJ/kg.K}$  foram usados respectivamente para determinar os fluxos de água fria e de água quente, baseados em Keating (1993, p.512-52), nas Equações (18.5) e (18.6).



$$\dot{m}_{af} = \frac{\dot{Q}_e}{Cp_{ag} \cdot (T_{18} - T_{19})} \quad (18.5)$$

$$\dot{m}_{aq} = \frac{\dot{Q}_c}{Cp_{ag} \cdot (T_{16} - T_{15})} \quad (18.6)$$

A vazão mássica de gases de exaustão, nos pontos 20 e 21, é determinada pela relação estequiométrica  $21,23 \text{ kg}_{ar}/\text{kg}_{biogás}$ , de acordo com Keating (1993), Barcla (1995, p.155) e Van Wylen e Sonntag (1993), Equação (18.7).

$$\dot{m}_{gases} = \dot{m}_b + \dot{m}_{ar} = \dot{m}_b + 21,23 \cdot \dot{m}_b = 22,23 \cdot \dot{m}_b \quad (18.7)$$

Por meio de cálculos, pode-se chegar aos seguintes fluxos mássicos do sistema de refrigeração apresentado na Figura 18.2, Tabela 18.2.

Tabela 18.2 – Vazões mássicas do sistema de refrigeração por absorção

FLUIDOS	PONTOS	VAZÕES MÁSSICAS [kg/s]	
		58Nm <sup>3</sup> /h	80Nm <sup>3</sup> /h
H <sub>2</sub> O + NH <sub>3</sub>	1	0,5000	0,7000
	2	0,5000	0,7000
	3	0,5000	0,7000
	4	0,2928	0,4142
	5	0,2928	0,4142
	6	0,2928	0,4142
	7	0,2283	0,3141
	8	0,0211	0,0283
	9	0,2072	0,2858
	10	0,2072	0,2858
	11	0,2072	0,2858
	12	0,2072	0,2858
H <sub>2</sub> O	13	10,9498	15,1032
	14	10,9498	15,1032
	15	10,9498	15,1032
	16	10,9498	15,1032
	17	5,2966	7,3057
	18	5,2966	7,3057
	19	5,2966	7,3057
GASES DE QUEIMA	20	0,3582	0,4940
	21	0,3582	0,4940

Para se determinar os fluxos de calor do absorvedor, gerador e retificador, as Equações (18.9) a (18.10) foram utilizadas. Essas equações foram obtidas também do balanço energético dos respectivos componentes.

$$\dot{Q}_a + \dot{m}_{12} h_{12} + \dot{m}_6 h_6 = \dot{m}_1 h_1 \quad (18.8)$$

$$\dot{Q}_g + \dot{m}_3 h_3 + \dot{m}_8 h_8 = \dot{m}_4 h_4 + \dot{m}_7 h_7 \quad (18.9)$$

$$\dot{Q}_r + \dot{m}_7 h_7 = \dot{m}_8 h_8 + \dot{m}_9 h_9 \quad (18.10)$$

Por último, a potência de bomba do sistema pode ser determinada pela Equação (18.11).

$$\dot{W}_b = \dot{m}_1 h_1 - \dot{m}_2 h_2 \quad (18.11)$$

A Tabela 18.3 mostra os fluxos energéticos obtidos em relação à vazão mínima de 58 Nm<sup>3</sup>/h e máxima de 80 Nm<sup>3</sup>/h de biogás respectivamente.

Tabela 18.3 – Dados gerais do sistema

ITEM [kW]	58 Nm <sup>3</sup> /h [kJ/s]	80 Nm <sup>3</sup> /h [kJ/s]
$\dot{Q}_a$	283,35	391,28
$\dot{Q}_c$	228,80	315,58
$\dot{Q}_e$	222,60	307,03
$\dot{Q}_g$	296,79	409,37
$\dot{Q}_r$	79,53	108,72
$\dot{W}_b$	1,52	2,13

O Gráfico 18.1 mostra as variações dos fluxos de calor em razão do volume de biogás produzido na ETE.

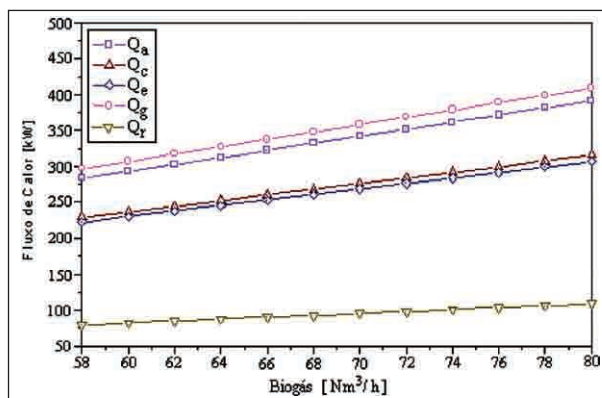


Gráfico 18.1 – Variação dos fluxos de calor em relação ao volume de biogás.

Por meio das Equações (18.5) e (18.6), os fluxos de água fria e de água quente foram obtidos e os resultados estão representados na Tabela 18.4.

Tabela 18.4 – Vazões de água fria e de água quente na máquina de absorção

FLUXOS	58 Nm <sup>3</sup> /h [kg/s]	80 Nm <sup>3</sup> /h [kg/s]
$\dot{m}_{af}$	5,30	7,31
$\dot{m}_{aq}$	10,95	15,10

O Gráfico 18.2 mostra as variações nas vazões mássicas de água fria e de água quente do sistema de refrigeração por absorção em razão da produção de biogás, para um faixa entre 58 Nm<sup>3</sup>/h e 80 Nm<sup>3</sup>/h.

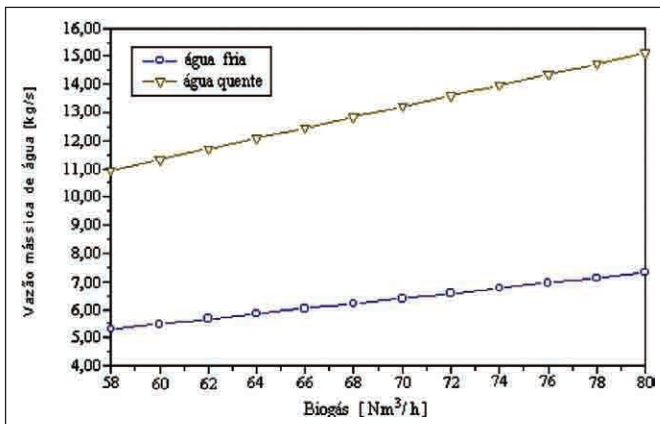


Gráfico 18.2 – Variação das vazões mássicas de água fria e quente em razão do volume de biogás.

## Sistema de refrigeração por compressão de vapor

### Configuração do sistema convencional

O Sistema de Refrigeração por Compressão de vapor (SRC), conforme mostrado na Figura 18.3, será dimensionado com a mesma capacidade frigorífica do SRA, de modo a permitir uma comparação direta entre os sistemas de refrigeração.

A Figura 18.3 mostra o ciclo da amônia no SRC. Inicialmente a amônia é comprimida e enviada para o condensador no ponto 1. Ela se liquefaz no condensador e é enviada para a válvula de expansão onde é expandida isoentalpicamente, o que ocasiona uma diminuição em sua temperatura e pressão. No evaporador é obtida uma solução rica em amônia e encaminhada ao compressor, reiniciando-se assim o ciclo.

Há uma produção de água quente por meio da passagem da água da rede pelo condensador, onde o calor liberado é utilizado para elevação da temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  para  $36^{\circ}\text{C}$ .

A produção de água gelada a  $1^{\circ}\text{C}$ , que é o objetivo deste trabalho, é obtida por meio da passagem de uma água de retorno do processo a  $11^{\circ}\text{C}$  pelo evaporador.

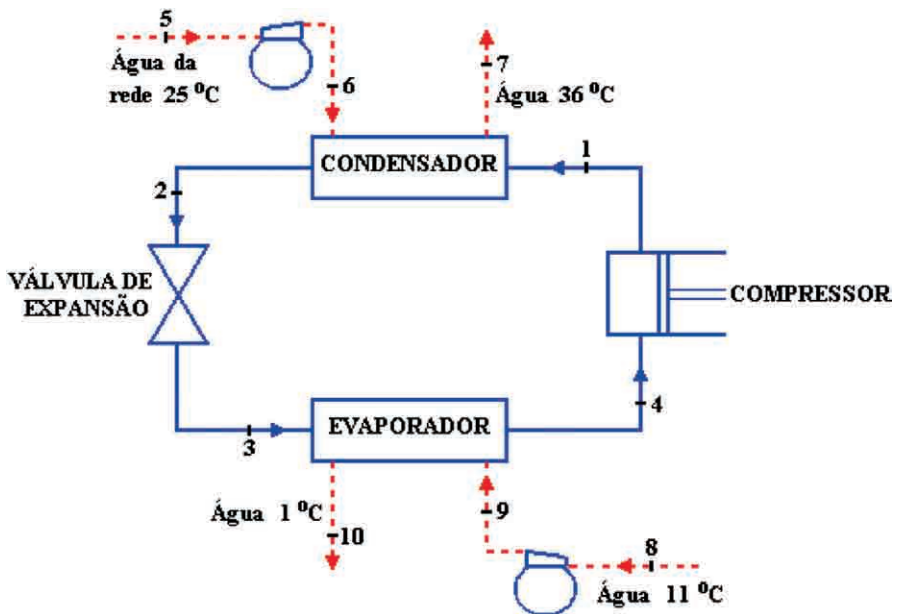


Figura 18.3 – Configuração do sistema de refrigeração por compressão de vapor.

A Tabela 18.5 caracteriza as propriedades termodinâmicas mostradas nos pontos da Figura 18.3 (Barcla, 1995, p.155).

Tabela 18.5 – Dados termodinâmicos do sistema de refrigeração por compressão da amônia

PONTOS	P [MPa]	T [°C]	h [kJ/kg]	s [kJ/kgk]
1	1,30	120,000	1705,30	5,619
2	1,20	30,000	322,50	1,200
3	0,30	-9,221	322,50	1,253
4	0,28	-4,000	1446,90	5,545
5	0,15	25,000	105,00	0,367
6	0,20	25,001	105,05	0,367
7	0,18	36,000	150,99	0,519
8	0,15	11,000	46,34	0,166
9	0,20	11,001	46,39	0,166
10	0,18	1,000	4,341	0,015

### Análise energética do sistema de refrigeração por compressão

As Equações (18.12) a (18.17) foram utilizadas para a análise energética do sistema de refrigeração por compressão de vapor.

$$\dot{Q}_e = \dot{m} \cdot (h_4 - h_3) \quad (18.12)$$

$$\dot{Q}_c = \dot{m} \cdot (h_2 - h_1) \quad (18.13)$$

$$\dot{W}_c = \dot{m} \cdot (h_4 - h_1) \quad (18.14)$$

$$\text{COP}_e = \frac{\dot{Q}_{ev}}{|\dot{W}_c|} \quad (18.15)$$

$$\text{COP}_q = \frac{|\dot{Q}_c|}{|\dot{W}_c|} \quad (18.16)$$

$$\text{COP}_t = \frac{|\dot{Q}_c| + |\dot{Q}_e|}{|\dot{W}_c|} \quad (18.17)$$

As mesmas potências frigoríficas associadas ao SRA, ou seja,  $\dot{Q}_e = 222,60$  kW (para  $58 \text{ Nm}^3/\text{h}$  de biogás) e  $\dot{Q}_e = 307,03$  kW (para  $80 \text{ Nm}^3/\text{h}$  de biogás), foram consideradas para o SRC.

O trabalho do compressor e os coeficientes de desempenho ( $\dot{W}_c$ ,  $\text{COP}_e$ ,  $\text{COP}_q$ ,  $\text{COP}_t$ ) propostos para o sistema foram obtidos por meio das considerações mencionadas e das Equações (18.12) a (18.17).

A Tabela 18.6 mostra os valores energéticos (fluxos de calor, trabalho do compressor e coeficientes de desempenho) no caso de SRC, comparativamente ao SRA.

Tabela 18.6 – Dados gerais do sistema convencional de compressão do vapor

ITEM		
$\dot{Q}_c$ [kW]	273,75	377,59
$\dot{Q}_e$ [kW]	222,60	307,03
$\dot{W}_c$ [kW]	51,16	70,56
$\text{COP}_e$	4,35	4,35
$\text{COP}_q$	5,35	5,35
$\text{COP}_t$	9,70	9,70

A Tabela 18.7 mostra os valores dos fluxos de mássicos da água e da amônia no SRC.

Tabela 18.7 – Fluxos mássicos do fluido refrigerante ( $\text{NH}_3$ ) e da água

FLUIDOS	PONTOS	Capacidade Frigorífica [kW]	
		222,60 kW	307,03 kW
$\text{NH}_3$	1	0,1980	0,2731
	2	0,1980	0,2731
	3	0,1980	0,2731
	4	0,1980	0,2731
$\text{H}_2\text{O}$	5	5,9551	8,2140
	6	5,9551	8,2140
	7	5,9551	8,2140
	8	5,2966	7,3057
	9	5,2966	7,3057
	10	5,2966	7,3057

O Gráfico 18.3 mostra as variações dos fluxos de calor em razão do volume de biogás no SRA, de modo a comparar a eficiência de ambos os sistemas.

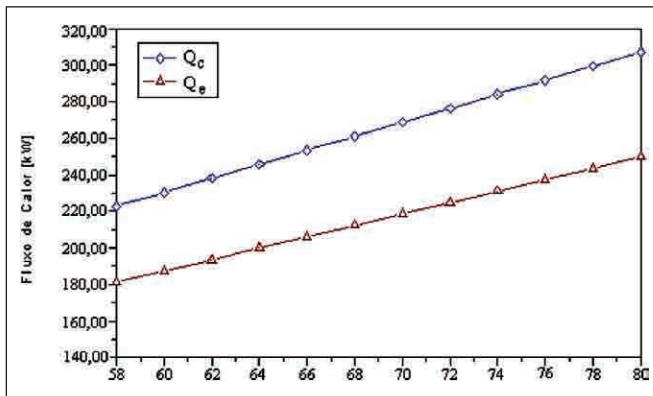


Gráfico 18.3 – Variação dos fluxos de calor.

A Tabela 18.8 mostra os fluxos de água fria e quente no SRC.

Tabela 18.8 – Vazões de água fria e de água quente na máquina de compressão em razão da capacidade frigorífica

FLUXOS	222,60 kW	307,03 kW
$\dot{m}_{af}$	5,30	7,31
$\dot{m}_{aq}$	5,96	8,21

## Análise econômica dos sistemas produtivos

A receita anual esperada foi determinada baseando-se nos custos de produção de água gelada nos dois sistemas (SRA e SRC), para a análise econômica proposta.

### Custos de investimentos

As Equações (18.18) e (18.19) definem os custos de investimentos para o sistema de refrigeração por absorção (incluindo sistema de queima) e

por compressão de vapor, e são válidas para a faixa de potência frigorífica entre 223 kW e 308 kW, de acordo com Silveira e Carvalho Jr. (1997) e Boehn (1987).

- Custo de investimento no SRA

$$I_{SRA} = 253000 \cdot \left( \frac{P_f}{264,815} \right)^{0,66} \quad [\text{US\$}] \quad (18.18)$$

- Custo de investimento no SRC

$$I_{SRC} = 192500 \cdot \left( \frac{P_f}{264,815} \right)^{0,53} \quad [\text{US\$}] \quad (18.19)$$

### Custos de manutenção nos sistemas

O custo de manutenção para o SRA é considerado de acordo com Boehn (1987), Equação (18.20).

$$CM_{SRA} = 0,1 \cdot \left( \frac{I_{SRA} \cdot f}{H \cdot P_f} \right) \quad [\text{US\$/kWh}] \quad (18.20)$$

A Equação (18.21) define o custo de manutenção para o sistema de refrigeração por compressão de vapor para uma potência frigorífica entre 20 kW e 5.000 kW, de acordo com (Silveira, 1994).

$$CM_{SRC} = 8000 \cdot \left( \frac{P_f}{1790} \right)^{0,42} \quad [\text{US\$/kWh}] \quad (18.21)$$

### Custos de produção de água gelada nos sistemas

As Equações (18.22) e (18.23) são utilizadas para o custo de produção de potência frigorífica adaptando-se as metodologias em Boehn (1987), Silveira e Nogueira (1992) e Kehlhofer (1987), sendo respectivamente o custo



de produção de água gelada no SRA e o custo de produção de água gelada no SRC.

$$C_A = \frac{I_{SRA} \cdot f}{H \cdot P_f} + \frac{C_b \cdot \dot{Q}_g}{P_f} + \frac{P_{el} \cdot W_b}{P_f} + CM_{SRA} \text{ [US\$/kWh]} \quad (18.22)$$

Note-se que, nessa metodologia de cálculo, o custo do biogás para a produção de água gelada leva em consideração a energia líquida utilizada, ou seja, o calor entregue no gerador.

$$C_C = \frac{I_{SRC} \cdot f}{H \cdot P_f} + \frac{P_{el}}{COP_e} + \frac{CM_{SRC}}{H \cdot P_f} \text{ [US\$/kWh]} \quad (18.23)$$

O fator de anuidade (f), indicado nas equações de custo, é determinado pela Equação (18.24).

$$f = \frac{q^k \cdot (q-1)}{q^k - 1} \quad (18.24)$$

sendo:

$$q = 1 + r/100 \quad (18.25)$$

A Tabela 18.9 mostra os parâmetros para a análise econômica para os sistemas de refrigeração propostos.

Tabela 18.9 – Parâmetros para a análise econômica

Taxa anual de juros (r)	12%
Payback (k)	3 anos
Horas de funcionamento da central (H)	7.000 h/ano
Preço de compra da eletricidade (P <sub>el</sub> )	0,069 US\$/kWh
Custo do biogás (C <sub>b</sub> )	variando entre 0,000 – 0,008 US\$/kWh

Deve-se ressaltar que será efetuada a variação de alguns parâmetros, permitindo observar a influência desses fatores na viabilidade econômica das instalações.

A Tabela 18.10 mostra os valores de investimentos (capital + instalação) e manutenção e a Tabela 18.11, o custo de produção de água gelada nos dois sistemas de refrigeração (SRA e SRC).

Tabela 18.10 – Valores de investimentos e de manutenções

	Investimentos			Manutenção	
	$P_f$ [kW]	$I_{SRA}$ [US\$]	$I_{SRC}$ [US\$]	$CM_{SRA}$ [US\$/kWh]	$CMSRC/H \cdot P_f$ [US\$/kWh]
<b>SRAa</b>	181,06	230061,64	0,00	0,0061465	0,0000000
<b>SRAb</b>	249,73	284457,21	0,00	0,0055010	0,0000000
<b>SRCa</b>	181,06	0,00	180134,07	0,0000000	0,0021391
<b>SRCb</b>	249,73	0,00	213605,96	0,0000000	0,0017751

\* Nota: a – Capacidade frigorífica de 222,6 kW; b – Capacidade frigorífica de 307,03 kW.

Tabela 18.11 – Custos de produção de água gelada em função do preço do biogás

$C_b$ [US\$/kWh]	Custo de produção de água gelada [US\$/kWh]			
	<b>SRAa</b>	<b>SRAb</b>	<b>SRCa</b>	<b>SRCb</b>
<b>0,000</b>	0,0619433	0,0610948	0,0661327	0,0590173
<b>0,002</b>	0,0646099	0,0637615	0,0661327	0,0590173
<b>0,004</b>	0,0672765	0,0664281	0,0661327	0,0590173
<b>0,006</b>	0,0699431	0,0690948	0,0661327	0,0590173
<b>0,008</b>	0,0726096	0,0717614	0,0661327	0,0590173

\* Nota: a – Capacidade frigorífica de 222,6 kW; b – Capacidade frigorífica de 307,03 kW.

## Cálculo da receita anual

A receita anual esperada é calculada pela soma dos ganhos ou benefícios anuais em razão da instalação do sistema na versão SRA em vez de SRC (ganhos pela produção de água gelada). A Equação (18.26) mostra os ganhos ou benefícios anuais pela instalação do sistema proposto, comparando SRA com SRC.

$$R = P_f \cdot H \cdot (C_C - C_A) \quad (18.26)$$

A Tabela 18.12 mostra a receita anual esperada, considerando três anos para o período de amortização de capital investido (*payback*) e uma taxa anual de juros de 12%, para diversos valores do custo do biogás.

Tabela 18.12 – Receita anual esperada

$C_b$ [US\$/kWh]	Receita anual esperada – R [US\$/ano]	
	SRAa	SRAb
0,000	6528,86	-4448,86
0,002	2368,46	-10187,26
0,004	-1791,93	-15925,65
0,006	-5936,74	-21642,54
0,008	-10097,14	-27380,94

\* Nota: a – Capacidade frigorífica de 222,6 kW; b – Capacidade frigorífica de 307,03 kW.

## Análise de sensibilidade

O Gráfico 18.4 mostra a influência da taxa de juros sobre o benefício anual esperado, considerando um custo do biogás em 0,000 US\$/kWh e um período de amortização de capital em cinco anos.

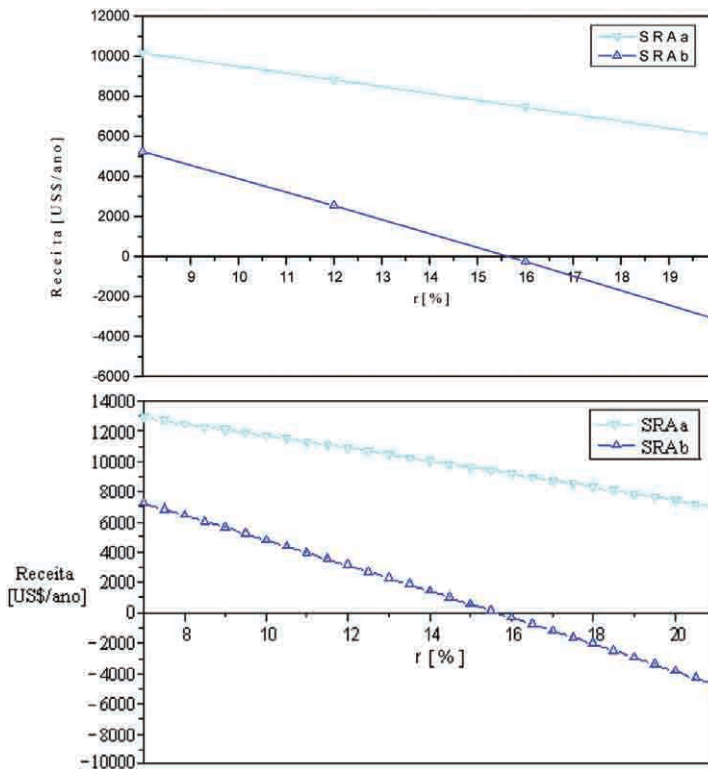


Gráfico 18.4 – Receita anual em razão da taxa de juros

Note-se que o SRAa é economicamente mais viável do que o SRAb, e esse torna-se economicamente viável para taxas de juros inferiores a 15,8% ao ano.

Mantendo-se o período de amortização de capital em cinco anos, os Gráficos 18.5 (taxa de juros de 8% ao ano) e 18.6 (taxa de juros de 12% ao ano) mostram a influência do preço do biogás sobre a viabilidade econômica do investimento.

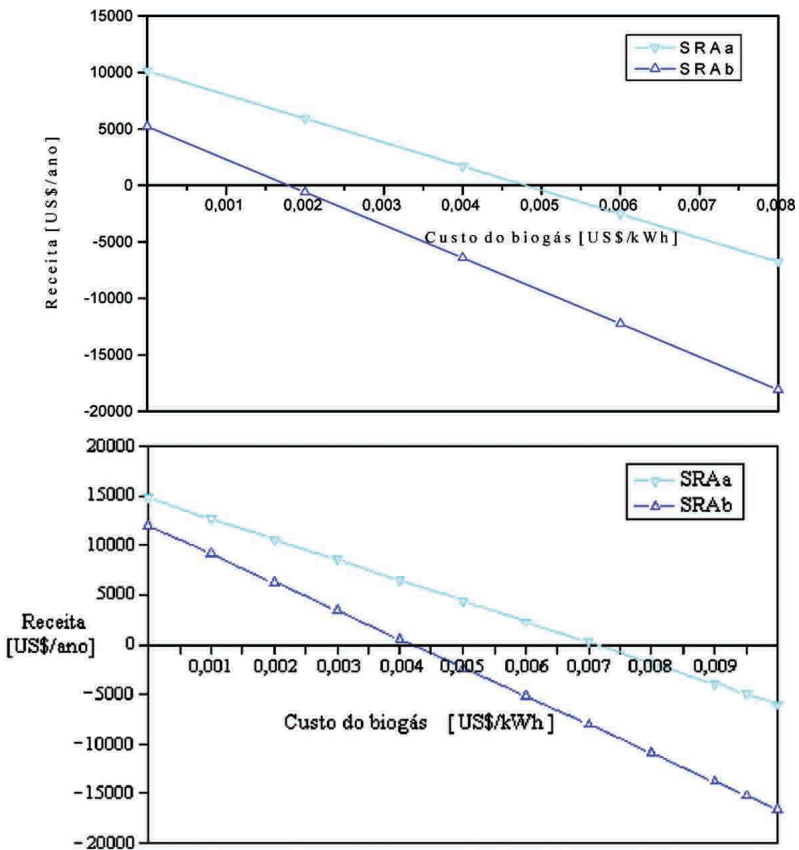


Gráfico 18.5 – Receita anual em razão do preço do biogás com taxa anual de juros de 8%.

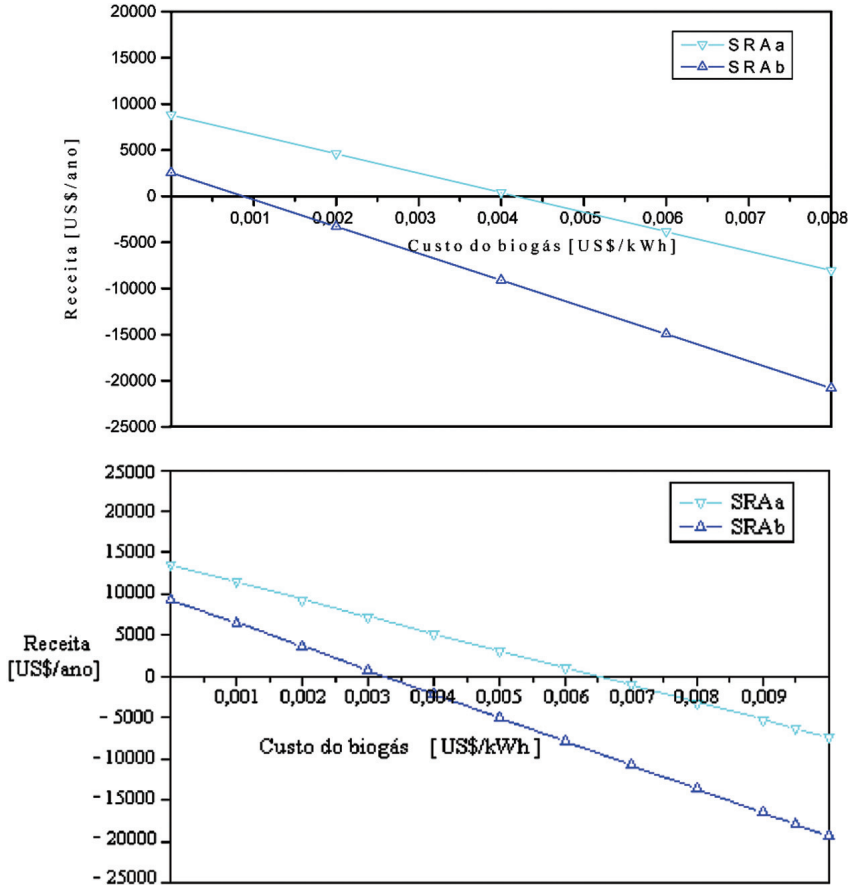


Gráfico 18.6 – Receita anual em razão do preço do biogás com taxa anual de juros de 12%.

O SRAa apresenta viabilidade econômica garantida para um custo de biogás de até 0,007 US\$/kWh (Figura 18.9) e 0,0065 US\$/kWh (Gráfico 18.7).

O Gráfico 18.7 mostra a influência do custo do biogás variando de 0,000 US\$/kWh a 0,008 US\$/kWh sobre a viabilidade econômica do investimento, considerando um taxa de juros de 12% ao ano.

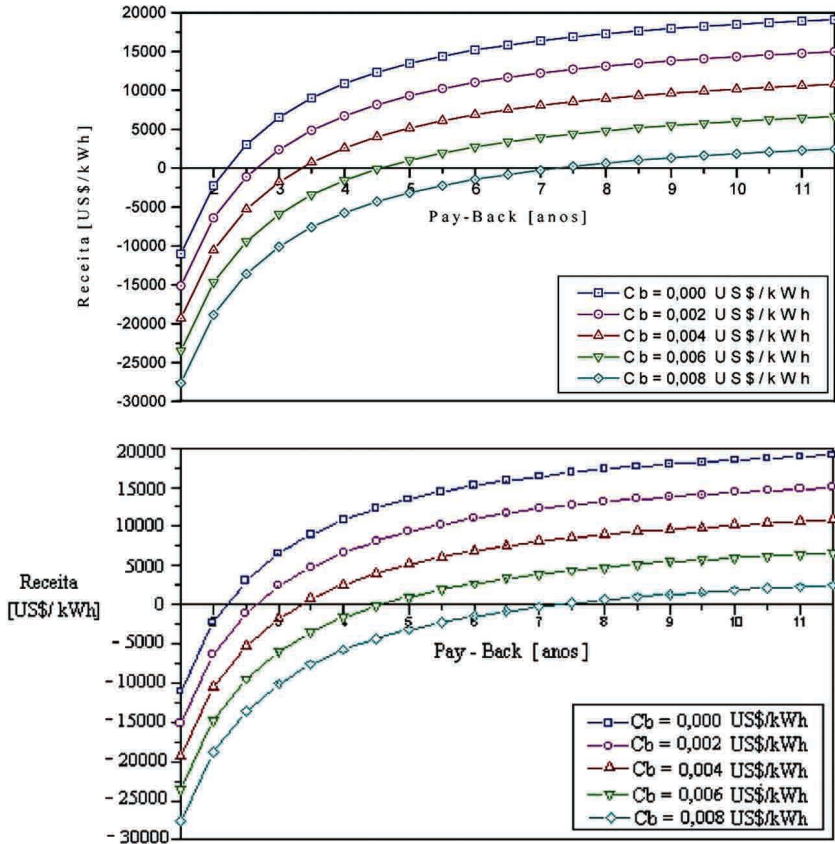


Gráfico 18.7 – Receita anual em função do preço do biogás.

O SRAa economicamente é o mais viável, com período de amortização de capital investido variando entre 2,2 anos (para  $C_b = 0,000$  US\$/kWh) e sete anos (para  $C_b = 0,008$  US\$/kWh).

## Conclusões

É possível utilizar o biogás gerado na ETE no laticínio estudado para a produção de água gelada complementar a  $1^\circ\text{C}$ , permitindo uso racional de energia nos estabelecimentos da fábrica. Nesse caso, a produção de água gelada é de aproximadamente 7,3 kg/s, considerando uma vazão média de biogás de  $80 \text{ Nm}^3/\text{h}$ .

Por meio da análise econômica determinou-se o custo de produção de água gelada para as vazões mínimas e máximas de biogás, considerando uma variação do custo de biogás entre 0,000 US\$/kWh e 0,008 US\$/kWh. A instalação do SRA proposto para o laticínio propiciou receita anual esperada positiva, baseado na soma dos ganhos anuais pela instalação do SRA, em vez do convencional SRC. A viabilidade econômica da instalação do SRA foi determinada com a variação de alguns parâmetros, permitindo observar a sensibilidade desses na sua instalação.

Com relação à influência da tarifa de eletricidade, é importante salientar que a tendência de aumento de seu valor implicará uma maior vantagem econômica da implantação do SRA na referida indústria.

## **Análise termoeconômica aplicada a uma miniestação de tratamento de esgoto com autossuficiência energética**

No Brasil, tem-se um quadro muito desfavorável com relação à rede de esgoto e ao seu tratamento, onde menos de 55% da população urbana tem rede de esgoto, e menos de 20% desse esgoto é tratado (Jordão; Além Sobrinho, 2004). Concomitantemente, há o aumento da contaminação dos corpos d'água, especialmente pelo descarte do esgoto *in natura*, o que aponta para uma muito provável carência de água potável, e o descarte na atmosfera de biogás originado nesse tratamento, o que é nocivo ao meio ambiente, em especial no tocante aos gases de estufa.

Os materiais que constituem o esgoto incluem resíduos alimentícios, esgoto sanitário e dejetos animais, que são substratos possíveis para a produção de gás metano por tratamento anaeróbio (ibidem). A partir dessa característica, um sistema composto por tratamentos anaeróbio, aeróbio e anóxico do esgoto pode ser considerado uma possibilidade viável, de baixo investimento e de grande benefício à população onde a água tratada pode ser utilizada para ferti-irrigação, o que diminui o uso de água potável para esse fim; o biofertilizante gerado a partir da separação dos resíduos sólidos, por processo anóxico, também pode ser aproveitado em áreas agrícolas; e o gás gerado pelo processo anaeróbio pode ser utilizado para acionamento de

um motor de combustão interna (MCI) que produz energia elétrica para, no mínimo, autossuficiência energética da miniestação de tratamento de esgoto (Lamas, 2007).

Este trabalho tem por objetivo avaliar, por meio da análise termoeconômica, a viabilidade econômica da miniestação de tratamento de esgoto (mini-ETE) instalada no campus de Guaratinguetá da Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (Unesp-FEG).

## Metodologia

Este trabalho segue a metodologia proposta por Lamas (2007), adaptada de Silveira (1998), realizando a identificação das funções que constituem o sistema em estudo, seguindo-se a construção de seu diagrama funcional termoeconômico, que é base para a formulação do problema de alocação de custos do tratamento de esgoto realizado na mini-ETE (determinação das funções exergéticas, determinação das equações de custo, cálculo dos custos associados e estudo da viabilidade econômica).

## Identificação das funções do sistema

A primeira parte da análise termoeconômica consiste em elaborar o diagrama do processo que permita visualizar todos os componentes e todos os fluxos de materiais relacionados à miniestação de tratamento de esgoto.

Os componentes da planta e os fluxos de materiais energéticos e exergéticos associados são indicados por números que destacam o relacionamento entre eles, que são utilizados na elaboração do diagrama funcional. A Figura 18.4 ilustra o diagrama de processo da mini-ETE.

Nesse diagrama é prevista a utilização dos insumos ali produzidos, especificamente a energia elétrica, biofertilizante e a água em condição de re-úso, respectivamente, para alimentação da sala de controle da mini-ETE, da iluminação e de uma bomba, e para irrigação de área verde próxima à mini-ETE. Esse aproveitamento da energia produzida pelo processo de



tratamento de esgoto adotado proporciona à mini-ETE sua autossuficiência energética.

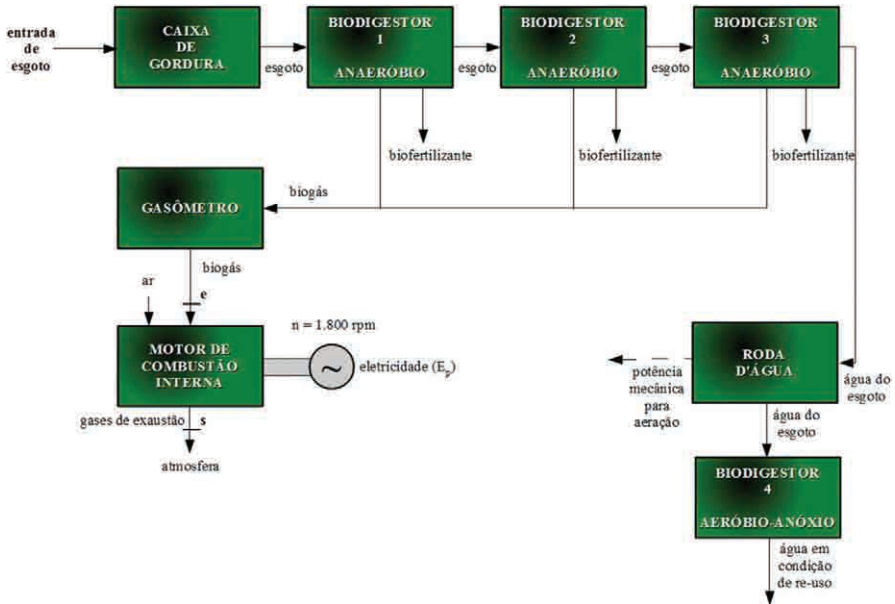


Figura 18.4 – Diagrama de processo para a mini-ETE.

A partir do diagrama de processo é elaborada a Tabela 18.13 que relaciona todas as características termodinâmicas da mini-ETE: tipo de fluido, vazão, pressão, temperatura, entalpia, entropia e exergia específica. Cada ponto indicado no diagrama de processo é representado na Tabela 18.13 por seu respectivo número.

Em razão da não disponibilidade de dados sobre o esgoto, para fins de cálculo, esse foi considerado como sendo líquido.

Segundo Snatural (2007), são necessários  $600 \text{ m}^3/\text{dia}$  de ar para cada  $100 \text{ m}^3/\text{dia}$  de esgoto tratado em biodigestor aeróbio. Assim, é possível estimar a relação ar/esgoto pela Equação (18.27).

$$\frac{\dot{m}_{\text{ar}}}{\dot{m}_{\text{es}}} = \frac{\rho_{\text{ar}} \cdot Q_{\text{ar}}}{\rho_{\text{es}} \cdot Q_{\text{es}}} \quad (18.27)$$

A Tabela 18.13 foi construída com dados obtidos de Godoy Jr. et al. (2004) para vazão, temperatura e pressão, sendo entalpia específica, entropia específica e exergia específica calculados com o programa aplicativo CATT2 (Borgnakke et al., 2003, p.577) e consultados em (Silveira, 1998).

Tabela 18.13 – Características da miniestação de tratamento de esgoto

Ponto	Fluido	Vazão kg/s	Pressão MPa	Temperatura K	Entalpia kJ/kg	Entropia kJ/kg.K	Exergia Específica kJ/kg
1	esgoto	0,0160806	0,200	298,15	105,00	0,3673	104,8
2	esgoto	0,0160806	0,200	298,15	105,00	0,3673	104,8
3	esgoto	0,01549896	0,180	298,20	105,20	0,3680	105,1
4	esgoto	0,01493837	0,160	298,25	105,40	0,3687	105,3
5	biogás	0,00167465	0,160	298,15	–	–	28.500 <sup>(*)</sup>
6	biogás	0,00167465	0,200	298,15	–	–	28.500 <sup>(*)</sup>
7	gases de exaustão	0,01494091	0,300	450,00	–	–	31,9
8	ar ambiente	0,10055596	0,101	298,15	–	–	0,0
9	água de esgoto	0,01439805	0,140	298,3	105,60	0,3694	105,5
10	água em condição de re-uso (pré- -tratada)	0,01439805	0,180	298,2	105,20	0,3680	105,1
11	biofertilizante	0,00000273	0,180	298,2	42,08	0,15	5.477,06 <sup>(*)</sup>
12	água em condição de re-uso (tratada)	0,01439805	0,180	298,15	105,00	0,3673	104,8
13	biofertilizante	0,00000263	0,160	298,25	42,160	0,147	5.477,06 <sup>(*)</sup>
14	biofertilizante	0,00000254	0,140	298,3	42,240	0,148	5.477,06 <sup>(*)</sup>
15	ar ambiente	0,02612447	0,101	298,15	–	–	0,0
16	biogás	0,00057890	0,160	298,15	–	–	28.500 <sup>(*)</sup>
17	biogás	0,00055796	0,160	298,15	–	–	28.500 <sup>(*)</sup>
18	biogás	0,00053778	0,160	298,15	–	–	28.500 <sup>(*)</sup>

(\*) As exergias específicas do biogás e do biofertilizante são seus próprios PCI.

## Construção do diagrama funcional termoeconômico

De acordo com o método desenvolvido por Silveira (1998) e com base no diagrama de processo apresentado (Figura 18.4), é elaborado o diagrama funcional termoeconômico para a mini-ETE, conforme ilustrado na Figura 18.5.

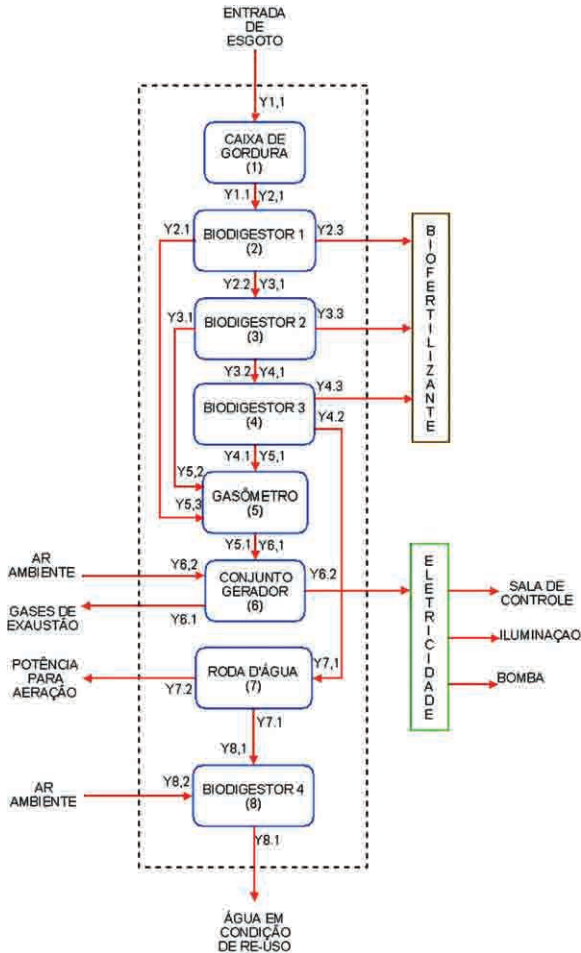


Figura 18.5 – Diagrama funcional termoeconômico para a mini-ETE.

## Formulação do problema de alocação dos custos do tratamento de esgoto

### Determinação das expressões para as funções exergeticas (restrições)

Para a determinação das funções exergeticas associadas ao diagrama funcional termoeconômico e de modo a simplificar os cálculos sem invalidar a análise, serão desprezadas as perdas nas tubulações.

A partir do diagrama de processo ilustrado na Figura 18.4 e dos valores das propriedades termodinâmicas indicadas na Tabela 18.13, pode-se determinar os valores dos fluxos exergeticos em base incremental, associados ao diagrama funcional termoeconômico ilustrado na Figura 18.5.

Unidade 1: Caixa de Gordura

$$Y_{1,1} = \dot{m}_1 \cdot [(h_1 - h_0) - T_0 \cdot (s_1 - s_0)] \quad (18.28)$$

$$Y_{1,1} = \dot{m}_2 \cdot [(h_2 - h_3) - T_0 \cdot (s_2 - s_3)] \quad (18.29)$$

Unidade 2: Biodigestor 1

$$Y_{2,1} = Y_{1,1} \quad (18.30)$$

$$Y_{2,1} = \dot{m}_{16} \cdot \text{PCI}_{\text{bg}} \quad (18.31)$$

$$Y_{2,2} = \dot{m}_3 \cdot [(h_3 - h_4) - T_0 \cdot (s_3 - s_4)] \quad (18.32)$$

$$Y_{2,3} = (0,6 \cdot \dot{m}_{11} \cdot \text{PCI}_{\text{bf}}) + \{0,4 \cdot \dot{m}_{11} \cdot [(h_{11} - h_3) - T_0 \cdot (s_{11} - s_3)]\} \quad (18.33)$$

Unidade 3: Biodigestor 2

$$Y_{3,1} = Y_{2,2} \quad (18.34)$$

$$Y_{3,1} = \dot{m}_{17} \cdot \text{PCI}_{\text{bg}} \quad (18.35)$$

$$Y_{3,2} = \dot{m}_4 \cdot [(h_4 - h_9) - T_0 \cdot (s_4 - s_9)] \quad (18.36)$$

$$Y_{3,3} = (0,6 \cdot \dot{m}_{13} \cdot \text{PCI}_{\text{bf}}) + \{0,4 \cdot \dot{m}_{13} \cdot [(h_{13} - h_4) - T_0 \cdot (s_{13} - s_4)]\} \quad (18.37)$$

Unidade 4: Biodigestor 3

$$Y_{4,1} = Y_{3,2} \quad (18.38)$$

$$Y_{4,1} = \dot{m}_{18} \cdot \text{PCI}_{\text{bg}} \quad (18.39)$$

$$Y_{4,2} = \dot{m}_9 \cdot g \cdot h_9 \quad (18.40)$$

$$Y_{4,3} = (0,6 \cdot \dot{m}_{14} \cdot \text{PCI}_{\text{bf}}) + \{0,4 \cdot \dot{m}_{14} \cdot [(h_{14} - h_9) - T_0 \cdot (s_{14} - s_9)]\} \quad (18.41)$$

Unidade 5: Gasômetro

$$Y_{5,1} = Y_{4,1} \quad (18.42)$$

$$Y_{5,2} = Y_{3,1} \quad (18.43)$$

$$Y_{5,3} = Y_{2,1} \quad (18.44)$$

$$Y_{5,1} = \dot{m}_6 \cdot \text{PCI}_{\text{bg}} \quad (18.45)$$

Unidade 6: Motor de Combustão Interna

$$Y_{6,1} = Y_{5,1} \quad (18.46)$$

$$Y_{6,2} = \dot{m}_{15} \cdot \text{cp}_{\text{ar}} \cdot \left[ (T_{15} - T_0) - T_0 \cdot \ln \left( \frac{T_{15}}{T_0} \right) \right] \quad (18.47)$$

$$Y_{6,1} = \dot{m}_7 \cdot \text{cp}_{\text{gases}} \cdot \left[ (T_7 - T_0) - T_0 \cdot \ln \left( \frac{T_7}{T_0} \right) \right] \quad (18.48)$$

$$Y_{6,2} = E_p \quad (18.49)$$

Unidade 7: Roda d'Água

$$Y_{7,1} = Y_{4,2} \quad (18.50)$$

$$Y_{7,1} = \dot{m}_{10} \cdot g \cdot h_{10} \quad (18.51)$$

$$Y_{7,2} = \dot{m}_9 \cdot g \cdot h_9 \quad (18.52)$$

Unidade 8: Biodigestor 4

$$Y_{8,1} = Y_{7,1} \quad (18.53)$$

$$Y_{8,2} = \dot{m}_8 \cdot \text{cp}_{\text{ar}} \cdot \left[ (T_8 - T_0) - T_0 \cdot \ln \left( \frac{T_8}{T_0} \right) \right] \quad (18.54)$$

$$Y_{8,1} = \dot{m}_{12} \cdot [(h_{12} - h_{10}) - T_0 \cdot (s_{12} - s_{10})] \quad (18.55)$$

A Tabela 18.14 relaciona os valores dos fluxos exergéticos associados às unidades relacionadas e descritas na Tabela 18.13, assim como nos diagramas de processo e funcional, ilustrados respectivamente nas Figuras 18.4 e 18.5.

Tabela 18.14 – Valores dos fluxos exergéticos associados à mini-ETE

Unidade 1: Caixa de Gordura			Unidade 5: Gasômetro		
	Valor	Udes.		Valor	Udes.
Y1,1	0	kW	Y5,1	15,3	kW
Y1.1	0,00014	kW	Y5,2	15,9	kW
Unidade 2: Biodigestor 1			Y5,3	16,5	kW
	Valor	Udes.	Y5.1	47,7	kW
Y2,1	0,00014	kW	Unidade 6: Motor		
Y2.1	16,5	kW		Valor	Udes.
Y2.2	0,00014	kW	Y6,1	47,7	kW
Y2.3	0,01498	kW	Y6,2	0	kW
Unidade 3: Biodigestor 2			Y6.1	0,47592	kW
	Valor	Udes.	Y6.2	3,3	kW
Y3,1	0,00014	kW	Unidade 7: Roda d'Água		
Y3.1	15,9	kW		Valor	Udes.
Y3.2	0,00013	kW	Y7,1	0,14193	kW
Y3.3	0,01444	kW	Y7.1	0,15300	kW
Unidade 4: Biodigestor 3			Y7.2	1,02001	kW
	Valor	Udes.	Unidade 8: Biodigestor 4		
Y4,1	0,00013	kW		Valor	Udes.
Y4.1	15,3	kW	Y8,1	0,15300	kW
Y4.2	0,14193	kW	Y8,2	0	kW
Y4.3	0,01392	kW	Y8.1	0,15300	kW

## Determinação das equações matemáticas dos custos dos produtos associados

A determinação das equações matemáticas do custo dos produtos associados é originada na análise do modelo estrutural baseado em custos ilustrado na Figura 18.6.



Figura 18.6 – Modelo estrutural baseado em custos para a mini-ETE.

Com o intuito de parametrizar os valores que serão aplicados às equações que serão desenvolvidas a seguir, foi elaborada a Tabela 18.15, que relaciona os valores de investimento nos diversos subsistemas da mini-ETE, os custos de operação e manutenção desses subsistemas, a quantidade de horas trabalhadas ao ano e as vazões dos produtos existentes na mini-ETE.

Tabela 18.15 – Valores de referência adotados

Variável	Valor
Período de trabalho – H	3.650 [h/ano]
Potência elétrica gerada – $E_p$	3,3 [kW]
Investimento na planta elétrica – $I_{el}$	800,00 [US\$]
Custo de operação e manutenção da planta elétrica – $C_{OMel}$	0,00600 [US\$/kWh]
Investimento nos biodigestores anaeróbios – $I_A$	2.000,00 [US\$]
Custo de operação e manutenção dos biodigestores anaeróbios – $C_{OMa}$	0,00100 [US\$/kWh]
Investimento no biodigestor aeróbio-anóxico – $I_{AA}$	500,00 [US\$]
Custo de operação e manutenção do biodigestor aeróbio-anóxico – $C_{OMaa}$	0,00100 [US\$/kWh]
Investimento na roda d'água – $I_r$	300,00 [US\$]
Custo de operação e manutenção da roda d'água – $C_{OMr}$	0,00100 [US\$/m <sup>3</sup> ]
Vazão do biogás – $Q_{bg}$	0,002 [m <sup>3</sup> /h]
Vazão da água pré-tratada – $Q_{ap}$	0,056 [m <sup>3</sup> /h]
Vazão da água tratada – $Q_{at}$	0,056 [m <sup>3</sup> /h]
Vazão do biofertilizante – $Q_{bf}$	0,00001 [m <sup>3</sup> /h]
Vazão do esgoto – $Q_{es}$	0,06 [m <sup>3</sup> /h]

As equações matemáticas do custo dos produtos associados possibilitam alocar os custos dos produtos gerados pela mini-ETE, quais sejam: custo de eletricidade ( $c_{el}$ ), custo do biofertilizante ( $c_{bf}$ ) e custo da água em condições de reúso ( $c_{at}$ ). Os demais custos são internos à mini-ETE, quais sejam: custo da produção de ar para aeração ( $c_{aer}$ ), custo da água pré-tratada ( $c_{ap}$ ) e custo do biogás gerado ( $c_{bg}$ ).

Assim, o custo de manufatura exergético ( $CM_{ex}$ ) pode ser definido pela Equação (18.56).

$$CM_{ex} = c_{el} \cdot Y_{6.2} + c_{bf} \cdot (Y_{2.3} + Y_{3.3} + Y_{4.3}) + c_{at} \cdot Y_{8.1} \quad (18.56)$$

A Equação (18.57) representa o custo da produção de eletricidade pelo MCI, considerando o investimento em equipamentos, o custo de operação e manutenção desses e o custo do biogás utilizado como combustível pelo motor empregado.

$$c_{el}[\text{US}\$/\text{kWh}] = \frac{I_{MCI} \cdot f}{H \cdot Y6.2} + c_{OM_{mci}} + c_{bg} \quad (18.57)$$

A Equação (18.58) representa o custo da produção de biogás, considerando o investimento nos biodigestores anaeróbios, incluindo o gasômetro, e o custo de operação e manutenção desse sistema.

$$c_{bg}[\text{US}\$/\text{kWh}] = \frac{I_A \cdot f}{H \cdot Y5.1} \cdot fp_{bg} + c_{OM_A} \quad (18.58)$$

Além desses custos, deve ser considerado o fator de ponderação do biogás, que reflete o percentual do investimento realizado que está relacionado à fração equivalente à produção de biogás no sistema de biodigestão anaeróbia, considerando todos os produtos ali gerados, sejam biogás, biofertilizante e água pré-tratada, Equação (18.59).

$$fp_{bg} = \frac{Y5.1}{Y5.1 + Y2.3 + Y3.3 + Y4.3 + Y4.2} \quad (18.59)$$

A Equação (18.60) representa o custo da produção de biofertilizante, considerando o investimento nos biodigestores anaeróbios e o custo de operação e manutenção do sistema. Analogamente ao biogás, para o biofertilizante também deve ser considerado seu fator de ponderação, Equação (18.61), ou seja, sua parcela de contribuição no investimento no biodigestor anaeróbio.

$$c_{bf}[\text{US}\$/\text{kWh}] = \frac{I_A \cdot f}{H \cdot (Y2.3 + Y3.3 + Y4.3)} \cdot fp_{bf} + C_{OM_A} \quad (18.60)$$

$$fp_{bf} = \frac{Y2.3 + Y3.3 + Y4.3}{Y5.1 + Y2.3 + Y3.3 + Y4.3 + Y4.2} \quad (18.61)$$

A Equação (18.62) representa o custo da produção de água pré-tratada, considerando o investimento nos biodigestores anaeróbios e o custo de operação e manutenção do sistema. O fator de ponderação da água pré-tratada está representado na Equação (18.63).

$$c_{ap}[\text{US}\$/\text{kWh}] = \frac{I_A \cdot f}{H \cdot Y4.2} \cdot fp_{ap} + c_{OM_A} \quad (18.62)$$

$$fp_{ap} = \frac{Y4.2}{Y5.1 + Y2.3 + Y3.3 + Y4.3 + Y4.2} \quad (18.63)$$



A Equação (18.64) representa o custo da produção de água tratada, que é composto pelo custo da água pré-tratada, pelo investimento no biodigestor aeróbio-anóxico e no seu custo de operação e manutenção.

$$c_{at}[\text{US}\$/\text{kWh}] = c_{ap} + \frac{I_{AA} \cdot f}{H \cdot Y_{8.1}} + c_{OM_{AA}} \quad (18.64)$$

A Equação (18.65) representa o custo da produção de ar para aeração, que é composto pelo investimento na roda d'água e pelo custo de operação e de sua manutenção.

$$c_{aer}[\text{US}\$/\text{kWh}] = \frac{I_r \cdot f}{H \cdot Y_{7.2}} + c_{OM_r} \quad (18.65)$$

Tabela 18.16 – Valores dos custos para mini-ETE nas diversas condições de análise

r (%aaa)	k (anos)	q	f	c <sub>bg</sub> (US\$/kWh)	c <sub>cd</sub> (US\$/kWh)	c <sub>aer</sub> (US\$/kWh)	c <sub>br</sub> (US\$/kWh)	c <sub>ap</sub> (US\$/kWh)	c <sub>at</sub> (US\$/kWh)	CM <sub>ex</sub> (US\$/h)
4	2	1,04	0,53	0,007	0,048	0,044	0,007	0,007	0,483	0,572
4	4	1,04	0,28	0,004	0,028	0,023	0,004	0,004	0,252	0,331
4	6	1,04	0,19	0,003	0,022	0,016	0,003	0,003	0,175	0,251
4	8	1,04	0,15	0,003	0,019	0,013	0,003	0,003	0,137	0,211
4	10	1,04	0,12	0,002	0,017	0,011	0,002	0,002	0,114	0,188
8	2	1,08	0,56	0,007	0,051	0,046	0,007	0,007	0,510	0,600
8	4	1,08	0,30	0,004	0,031	0,025	0,004	0,004	0,276	0,356
8	6	1,08	0,22	0,003	0,024	0,018	0,003	0,003	0,198	0,275
8	8	1,08	0,17	0,003	0,021	0,015	0,003	0,003	0,160	0,236
8	10	1,08	0,15	0,003	0,019	0,013	0,003	0,003	0,137	0,212
12	2	1,12	0,59	0,008	0,053	0,049	0,008	0,008	0,539	0,630
12	4	1,12	0,33	0,005	0,033	0,028	0,005	0,005	0,301	0,382
12	6	1,12	0,24	0,004	0,026	0,021	0,004	0,004	0,223	0,301
12	8	1,12	0,20	0,003	0,023	0,017	0,003	0,003	0,185	0,261
12	10	1,12	0,18	0,003	0,021	0,015	0,003	0,003	0,162	0,238
16	2	1,16	0,62	0,008	0,056	0,051	0,008	0,008	0,567	0,659
16	4	1,16	0,36	0,005	0,035	0,030	0,005	0,005	0,326	0,409
16	6	1,16	0,27	0,004	0,028	0,023	0,004	0,004	0,248	0,327
16	8	1,16	0,23	0,004	0,025	0,020	0,004	0,004	0,211	0,289
16	10	1,16	0,21	0,003	0,023	0,018	0,003	0,003	0,190	0,267

## Cálculo dos custos associados à mini-ETE

Os valores relacionados na Tabela 18.15 são aplicados às Equações (18.56) a (18.65) para obter os custos dos produtos da mini-ETE para as condições de análise estabelecidas: taxas de juros de 4%, 8%, 12% e 16% a.a., e períodos de amortização de dois, quatro, seis, oito e dez anos.

As Equações (18.66) e (18.67) são utilizadas para o cálculo do fator de anuidade necessário ao desenvolvimento dos cálculos dos custos dos produtos associados à mini-ETE.

$$f = \frac{q^k \cdot (q-1)}{q^k - 1} \quad (18.66)$$

$$q = 1 + \frac{r}{100} \quad (18.67)$$

A Tabela 18.16 relaciona os valores dos custos dos produtos da mini-ETE, assim como os fatores de anuidade, para as condições de análise estabelecidas, e os períodos de amortização e as taxas de juros estão baseados nos valores praticados comercialmente, orientados pelo Banco Central do Brasil (Bacen, 2006).

Os Gráficos 18.8 a 18.13 ilustram as curvas de desempenho dos valores obtidos para os custos dos produtos da mini-ETE.

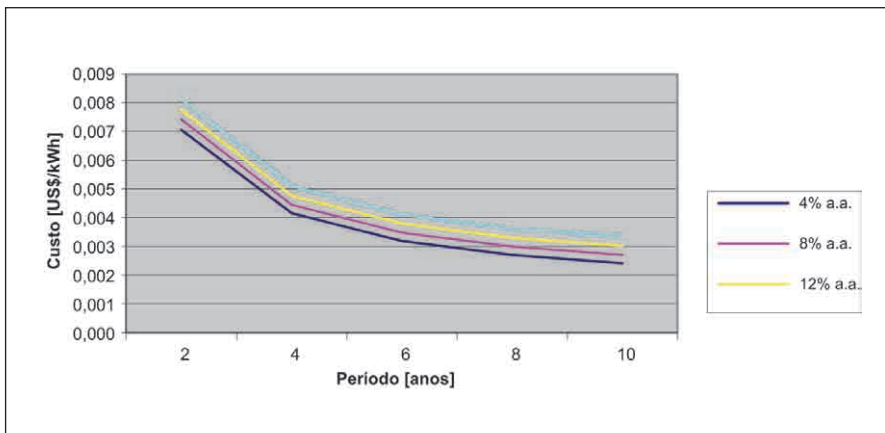


Gráfico 18.8 – Custos da água de esgoto que é pré-tratada pela mini-ETE.

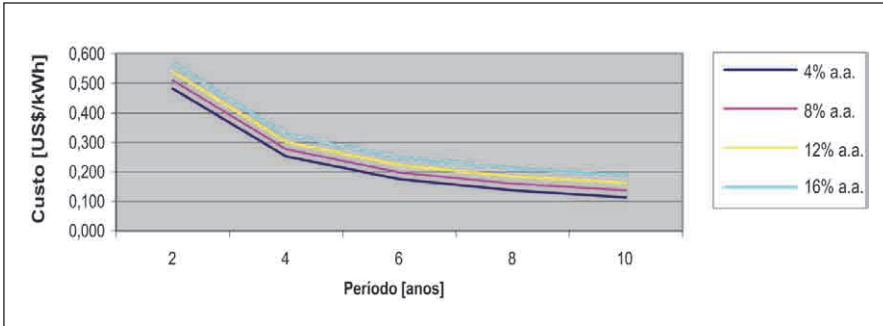


Gráfico 18.9 – Custos da água de esgoto que é tratada pela mini-ETE.

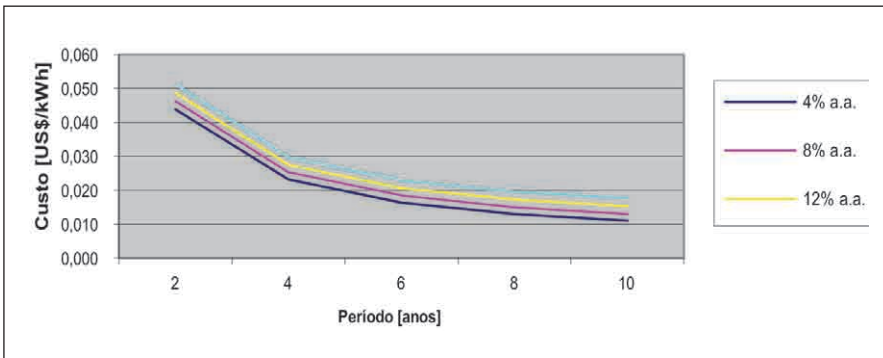


Gráfico 18.10 – Custos do ar produzido para aeração na mini-ETE.

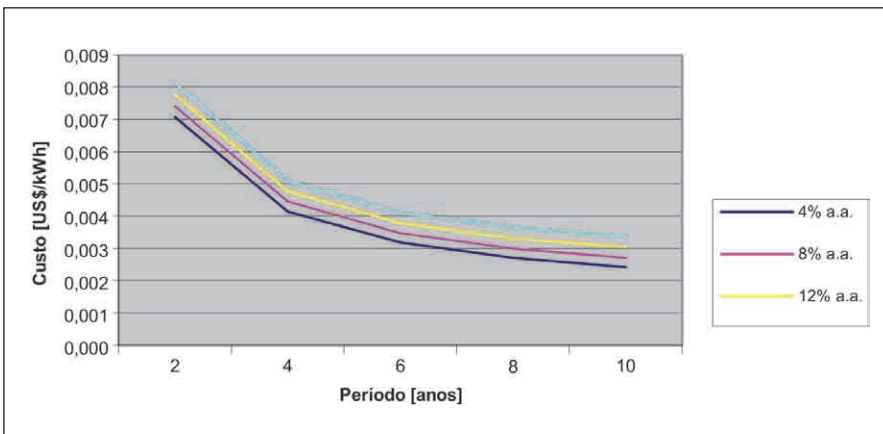


Gráfico 18.11 – Custos do biofertilizante produzido pela mini-ETE.

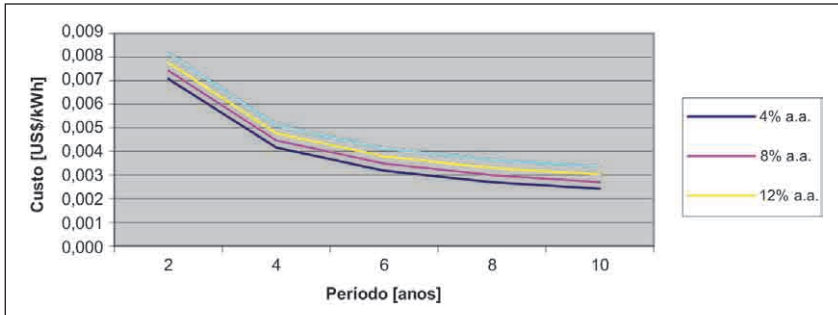


Gráfico 18.12 – Custos do biogás produzido pela mini-ETE.

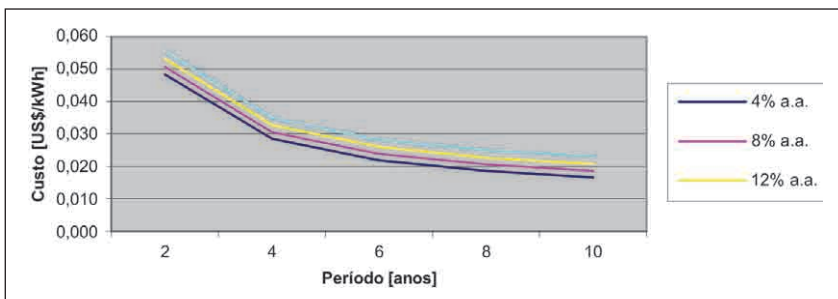


Gráfico 18.13 – Custos da eletricidade gerada no MCI da mini-ETE.

Esses gráficos possibilitam observar o período de retorno do capital investido (*payback*) na mini-ETE, de acordo com o desempenho de cada um dos produtos associados.

O Gráfico 18.14 ilustra o custo de manufatura exergetico ( $CM_{ex}$ ) da mini-ETE, considerando os custos dos produtos e suas exergias.

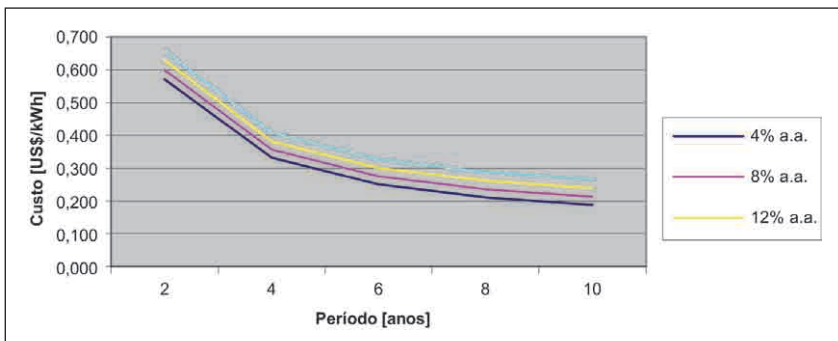


Gráfico 18.14 – Custo de manufatura exergetico da mini-ETE.

Em todos os gráficos é possível observar que os custos associados decrescem com a proximidade do período de retorno do capital investido (*payback*). Outro fator que influencia diretamente o desempenho dos custos é o valor do capital investido, que é dependente da taxa de juros e do período de amortização desse capital.

## Estudo da viabilidade econômica

Tendo como referência os valores praticados pelas concessionárias do serviço de tratamento de água e esgoto no território nacional, além das taxas de juros e períodos de amortecimento adotados, é realizado o levantamento das receitas de capital para as condições estabelecidas.

A Equação (18.68) apresenta a relação entre os custos de água tratada pela mini-ETE e pela média nacional das concessionárias do serviço de tratamento de esgoto e a vazão volumétrica de esgoto da mini-ETE, assim como o custo da eletricidade gerada pela mini-ETE e a média nacional praticada pelas concessionárias de distribuição da rede elétrica.

$$R \left[ \frac{\text{US\$}}{\text{ano}} \right] = \left\{ \left[ (P_{el} - C_{el}) \cdot P_{ti} \right] + \left[ (C_{at_{cia}} - C_{at_{etc}}) \cdot Q_{at} \right] \right\} \cdot H \quad (18.68)$$

As Equações (18.69) e (18.70) são utilizadas para o cálculo do custo da água tratada em base volumétrica.

$$c_{ap} \left[ \frac{\text{US\$}}{\text{m}^3} \right] = \frac{I_A \cdot f}{H \cdot Q_{ap}} \cdot \left( \frac{Q_{bf}}{Q_{bg} + Q_{bf} + Q_{ap}} \right) + C_{OM_A} \quad (18.69)$$

$$c_{at} \left[ \frac{\text{US\$}}{\text{m}^3} \right] = c_{ap} + \frac{I_{AA} \cdot f}{H \cdot Q_{at}} + C_{OM_{AA}} \quad (18.70)$$

A Equação (18.68), elaborada para cálculo da receita anual de um sistema de tratamento de esgoto com autossuficiência energética, é utilizada para construir a Tabela 18.16, que relaciona os valores calculados, considerando o valor médio de tarifação praticado no país, que é de 70,00US\$/MWh, segundo a Aneel (2006), e o valor de 0,70US\$/m<sup>3</sup> de esgoto tratado (Godoy Jr. et al., 2004).

Tabela 18.17 – Valores da receita para a mini-ETE nos períodos observados

r (%aa)	k (anos)	Pel-Cel (US\$/kWh)	Pti (kW)	Ccia-Cae (US\$/m <sup>3</sup> )	Qae (m <sup>3</sup> /h)	H (h/ano)	R (US\$/ano)
4	2	0,022	3,3	-0,702	0,056	3650	118,29
4	4	0,042	3,3	-0,029	0,056	3650	494,50
4	6	0,048	3,3	0,194	0,056	3650	619,65
4	8	0,051	3,3	0,306	0,056	3650	682,03
4	10	0,053	3,3	0,372	0,056	3650	719,31
8	2	0,019	3,3	-0,782	0,056	3650	73,13
8	4	0,039	3,3	-0,099	0,056	3650	455,46
8	6	0,046	3,3	0,127	0,056	3650	581,91
8	8	0,049	3,3	0,239	0,056	3650	644,39
8	10	0,051	3,3	0,305	0,056	3650	681,29
12	2	0,017	3,3	-0,864	0,056	3650	27,45
12	4	0,037	3,3	-0,171	0,056	3650	415,12
12	6	0,044	3,3	0,056	0,056	3650	542,16
12	8	0,047	3,3	0,167	0,056	3650	604,08
12	10	0,049	3,3	0,231	0,056	3650	640,00
16	2	0,014	3,3	-0,947	0,056	3650	-18,73
16	4	0,035	3,3	-0,246	0,056	3650	373,56
16	6	0,042	3,3	-0,019	0,056	3650	500,56
16	8	0,045	3,3	0,090	0,056	3650	561,36
16	10	0,047	3,3	0,152	0,056	3650	595,81

O Gráfico 18.15 ilustra o desempenho econômico da mini-ETE para as várias condições observadas.

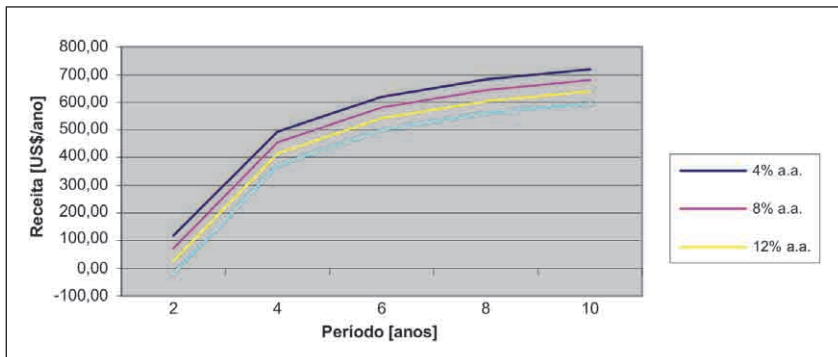


Gráfico 18.15 – Receita anual para a mini-ETE nos períodos observados.

A partir do Gráfico 18.15 é possível observar que, para as diversas taxas de juros aplicadas, o retorno do investimento na implantação de uma mini-ETE é de aproximadamente um ano.

Observa-se que quanto menor a taxa de juros e o tempo de amortização, tanto menores são os custos dos produtos associados; assim, a receita torna-se maior e, como consequência, o retorno do investimento ocorre em menos tempo.

## Conclusão

A aplicação dessa metodologia à miniestação de tratamento de esgoto implantada na Unesp-FEG possibilitou avaliar a sua viabilidade econômica a partir do retorno do capital investido, considerando o custo em base exergética dos produtos ali gerados.

Os resultados obtidos corroboraram a expectativa da viabilidade econômica da mini-ETE, haja vista os períodos de *payback* observados, inferiores a um ano (Gráfico 18.15).

## Referências bibliográficas

- ANEEL. Política tarifária. Agência Nacional de Energia Elétrica, Brasília, DF, Brasil. [Online]. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br>>. Acesso em: fev. 2006.
- BACEN – Banco Central. Relatório de Economia Bancária e Crédito. Banco Central do Brasil, Brasília, DF, Brasil. [Online]. Disponível em: <<http://www.bacen.gov.br>>. Acesso em: fev. 2006.
- BARCLA, L. *Combined power and process: an exergy approach*. London: Mechanical Engineering Publications Limited, 1995.
- BOEHN, R. F. *Design analysis of thermal systems*. New York: John Wiley, 1987.
- BORGNAKKE, C. et al. *Fundamentos da termodinâmica*. 6.ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2003.
- COSTA, E. C. *Física industrial: refrigeração*. Porto Alegre: Editora Meridional – Emma, 1976. v.II. 175p.
- GASTALDONI, T. O biogás como combustível automotivo. In: ENCONTRO SOBRE BIOGÁS AUTOMOTIVO. Brasília. *Anais...* Brasília: Embraer, 1985. 47p.
- GODOY JÚNIOR, E. et al. Miniestações de tratamento de esgoto e reuso de águas associada a sistema de cogeração energética no aproveitamento do biogás produzi-

- do. In: XI SIMPÓSIO LUSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. Natal. *Anais...* Natal, Brasil, 2004.
- HEROLD, K. et al. *Absorption chillers and heat pumps*. New York: CRC Press, 1996.
- JORDÃO, E. P.; ALÉM SOBRINHO, P. *Pesquisa e experiência com pós-tratamento para reatores UASB no Brasil*. Relatório Prosab/Finep, 2004.
- LAMAS, W. Q. *Análise termoeconômica de uma miniestação de tratamento de esgoto com auto-suficiência energética*. 2007. 107f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Guaratinguetá, 2007.
- KEATING, E. L. *Applied combustion*. S. l.: Marcel Dekker, Inc., 1993.
- KEHLHOFER, R. *A comparison of power plants for cogeneration of heat and electricity*. Zurich: BBC Brown Boveri, 1987.
- LIZARRAGA, J. M. S. *Cogeneración: aspectos termodinámicos, tecnológicos y económicos*. 2.ed. Bilbao: Servicio Editorial de la Universidad del país Vasco, 1994.
- PETBOW, G. S. Catálogo do fabricante, 1998.
- PIRES, N. J. R. M. T. T. E. *Final project – biogas*. 1996. Disponível em: <[http://morange.esb.ucp.pt/~n\\_pires/p4.htm](http://morange.esb.ucp.pt/~n_pires/p4.htm)>. Acessado em: 8 ago. 1998.
- SILVEIRA, J. L. *Cogeração disseminada para pequenos usuários: estudos de casos para o setor terciário*. 1994. 193f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1994.
- \_\_\_\_\_. *Uma contribuição para a modelagem termoeconômica: otimização da operação e do projeto de sistemas energéticos*. 1998. 98f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Guaratinguetá, 1998.
- SILVEIRA, J. L.; CARVALHO JUNIOR, J. A. *Proposta de assessoria técnica: estudo para melhorar em 30% o sistema de geração de água gelada na Leite Paulista*. Maio 1997. (Mimeog.)
- SILVEIRA, J. L.; NOGUEIRA, L. H. N. Thermoeconomic functional analysis applied in cogeneration systems associated to cellulose plants. In: THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EFFICIENCY, COSTS, OPTIMIZATION AND SIMULATION OF ENERGY SYSTEMS – ECOS’92. *Proceedings...* ASME, Zaragoza, Spain, 1992. p.3811-86, 1992.
- SNATURAL. *A aeração no tratamento de efluentes com aeradores (tratamento aeróbio) por ar difuso*. SNatural – Tecnologia Ambiental Ltda., São Paulo, Brasil. [Online]. Disponível em: <<http://www.snatural.com.br/Efluentes.htm>>. Acesso em: jun. 2007.
- VAN WYLEN, G. J.; SONNTAG, R. E. *Fundamentos da termodinâmica clássica*. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 1993.
- VILLELA, I. A C. et al. *Utilização do biogás gerado na estação de tratamento de efluentes de uma cooperativa: análise energética no sistema de refrigeração por absorção NH<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O*, 1985. 47p. (Mimeog.)





## **Biodiesel e gás de gaseificação em motor de combustão interna**

*José Luz Silveira, Wendell de Queiróz Lamas, Julio Santana Antunes,  
Celso Eduardo Tuna, Christian Jeremi Coronado Rodriguez,  
Ronney Arismel Mancebo Boloy, Rodolfo dos Santos*

### **Eficiência ecológica em motores de combustão interna usando biodiesel**

Os setores que mais poluem são o industrial e o de transporte automotivo. Assim sendo, é necessário que ambos adotem estratégias futuras para reduzir a emissão de poluentes na atmosfera, com a finalidade de prevenir as concentrações perigosas no ar. Tais poluentes no ar exercem uma influência nociva sobre os organismos vivos, piorando as condições de vida e produzindo danos até mesmo na mesma infraestrutura urbana.

Anualmente se desprendem na atmosfera aproximadamente 700 milhões de toneladas de monóxido de carbono, 150 milhões de toneladas de óxidos de nitrogênio, 200 milhões de toneladas de partículas sólidas e 200 milhões de toneladas de dióxidos de enxofre, entre outros. A maioria dessas substâncias é produzida pelo setor de transportes. Atualmente, os Motores de Combustão Interna (MCI) consomem perto de 85% da energia consumida na Terra, dos quais os motores dos veículos a constituem em grande parte. Os gases de exaustão que contêm substâncias tóxicas representam um dos fatores mais perigosos de poluição do meio ambiente (Patrakhaltsev et al., 1993).

A metodologia proposta neste trabalho analisa a eficiência ecológica em motores de combustão, considerando as concentrações separadas dos gases emitidos ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_2$  e  $\text{NO}_x$ ), assim como o material particulado. O parâmetro de eficiência ecológica ( $\epsilon$ ) foi proposto pelos pesquisadores Cardu e Baica (1999a) para ciclos de vapor usando carvão e foi ampliado por Salomon (2003) para plantas com ciclo combinado que usam gás natural, motores de combustão interna e ciclos avançados usando biomassa como combustível. A eficiência ecológica avalia o impacto ambiental causado pelas emissões nos MCI, considerando a combustão de 1 kg de combustível e não a quantidade de gases liberados na geração de uma unidade de potência.

## O dióxido de carbono equivalente

O dióxido de carbono equivalente ( $\text{CO}_2)_e$  é um fator de concentração de poluentes empírico e foi definido por Cardu e Baica (1999b). Para o cálculo desse coeficiente, o valor máximo permitido de concentração de  $\text{CO}_2$  é dividido pelos correspondentes padrões de qualidade de ar para o  $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_2$  e MP (material particulado) em uma hora. A expressão para determinar o  $(\text{CO}_2)_e$  é representada pela Equação (19.1).

$$(\text{CO}_2)_e = (\text{CO}_2) + 80 (\text{SO}_2) + 50 (\text{NO}_x) + 67 (\text{MP}) \quad (19.1)$$

As unidades dos componentes químicos na Equação (19.1) são em kg por kg de combustível. Nessa mesma equação, o dióxido de enxofre equivalente  $(\text{SO}_2)_e = 80(\text{SO}_2)$ , o óxido de nitrogênio equivalente  $(\text{NO}_x)_e = 50(\text{NO}_x)$  e o material particulado equivalente  $(\text{MP})_e = 67(\text{MP})$ . O melhor combustível do ponto de vista ecológico é aquele que apresenta a mínima quantidade de  $(\text{CO}_2)_e$ , dióxido de carbono equivalente, originado a partir de sua queima. Para quantificar o impacto ambiental, é definido um indicador poluente ( $\Pi_g$ ), de acordo com a Equação (19.2).

$$\Pi_g = \frac{(\text{CO}_2)_e}{Q_i} \quad (19.2)$$

onde,  $(CO_2)_e$  em kg/kg (kg por kg de combustível),  $Q_i$  em MJ/kg é o PCI (poder calorífico inferior) e  $(\Pi_g)$  em kg/MJ é o indicador poluente.

### Eficiência ecológica

A eficiência ecológica ( $\varepsilon$ ) é definida como um indicador que permite a avaliação do impacto ambiental das emissões gasosas, nesse caso de motores de combustão interna em meios de transporte, comparando o indicador poluente, emissões de  $(CO_2)_e$ , e os padrões de qualidade de ar existentes. A eficiência da conversão é também considerada um fator determinante nas emissões específicas. De acordo com Cardu e Baica (1999a, 199b, 2001), a eficiência ecológica pode ser determinada pela Equação (19.3).

$$\varepsilon = \left[ \frac{0,204\eta}{\eta + \Pi_g} \text{Ln}(135 - \Pi_g) \right]^{0,5} \tag{19.3}$$

onde “ $\varepsilon$ ” é o coeficiente que define a intensidade do impacto ambiental dos motores de combustão interna (eficiência ecológica). Esse coeficiente engloba os seguintes aspectos: composição do combustível, tecnologia de combustão, indicador de poluição e eficiência na conversão ( $\eta$ ). O valor de “ $\varepsilon$ ” é diretamente proporcional à eficiência dos motores de combustão interna e inversamente proporcional ao valor do indicador poluente ( $\Pi_g$ ).

Uma situação é considerada insatisfatória do ponto de vista ecológico quando  $\varepsilon = 0$ , mas quando  $\varepsilon = 1$  indica uma situação ideal. De acordo com a classificação de combustíveis, a queima do hidrogênio puro teria 0% de impacto ao meio ambiente, enquanto a queima do enxofre causaria 100% de impacto (Tabela 19.1).

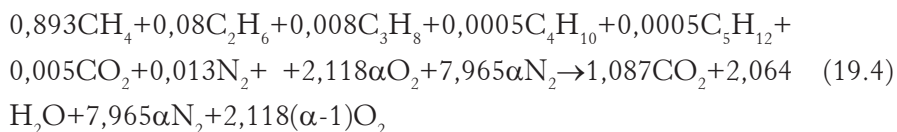
Tabela 19.1 – Características de combustíveis virtuais

Combustível	S %	CO <sub>2</sub> (kg/kg combustível)	Q <sub>i</sub> (Mj/kgf)	Π <sub>g</sub> (kg/MJ)	ε
Hidrogênio	–	0	10742	0	1
Enxofre	100	1400	10450	134	0

Fonte: Villela ; Silveira (2007)

## Queima do gás natural em MCI

Adotando-se a composição volumétrica do gás natural fornecido pela Comgás (2010): CH<sub>4</sub> (metano) 89,3%; C<sub>2</sub>H<sub>6</sub> (etano) 8%; C<sub>3</sub>H<sub>8</sub> (propano) 0,8%; C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> e C<sub>5</sub>H<sub>12</sub> (butano e pentano) 0,1%; CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono); 0,5% e N<sub>2</sub> (nitrogênio) 1,3%. Com essa composição a sua massa molecular é 17,689 g.gmol<sup>-1</sup> e sua densidade é 789,68 kg/Nm<sup>3</sup>. A Equação (19.4) representa o caso com excesso de ar na combustão de gás natural.



## Cálculo da eficiência ecológica

A Tabela 19.2 mostra uma comparação entre os principais combustíveis analisados: o Gráfico 19.1 mostra os valores de eficiência ecológica encontrados para os quatro combustíveis analisados: gás natural, diesel, gasolina, biodiesel (B100 e B20); o Gráfico 19.2 mostra os valores de eficiência ecológica em função da eficiência em MCI.

Tabela 19.2 – Comparação dos resultados das emissões

Emissões poluentes (kg/kg <sub>comb</sub> )	Gás. Nat.	Diesel	Gasolina *	Álcool **	Biodiesel B20	Biodiesel B100	Diesel/B100
(CO <sub>2</sub> ) <sub>e</sub>	2,727	8,529	5,452	3,269	7,502	3,423	2,5
MP	1,71·10 <sup>-5</sup>	15,27·10 <sup>-3</sup>	1,920·10 <sup>-3</sup>	1,920·10 <sup>-3</sup>	14,21·10 <sup>-3</sup>	9,931·10 <sup>-3</sup>	1,5
NO <sub>x</sub>	4,412·10 <sup>-4</sup>	4·10 <sup>-2</sup>	5,5·10 <sup>-2</sup>	5,5·10 <sup>-2</sup>	4,04·10 <sup>-2</sup>	4,2·10 <sup>-2</sup>	0,9
SO <sub>2</sub>	1,213·10 <sup>-6</sup>	3·10 <sup>-2</sup>	0,2·10 <sup>-3</sup>	–	2,4·10 <sup>-2</sup>	–	–
CO <sub>2</sub>	2,704	3,106	2,413	0,391	2,61	0,658	4,7
Total (kg/kg <sub>comb</sub> )	2,704	3,161	2,472	0,448	2,689	0,71	4,4
Efic. Ecol. (%)	91,95	77,34	82,84	84,97	78,94	87,58	0,8

\* Gasolina com 25% de álcool etílico.

\*\* Considerando o ciclo do etanol

Fonte: Coronado-Rodríguez et al. (2009)

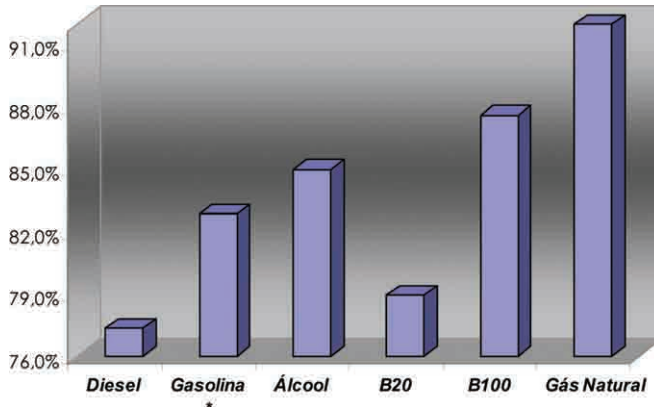


Gráfico 19.1 – Eficiência ecológica do Diesel, Gasolina\*, B20 e B100

\*Gasolina com 25% de álcool etílico

Fonte: Coronado-Rodríguez et al. (2009)

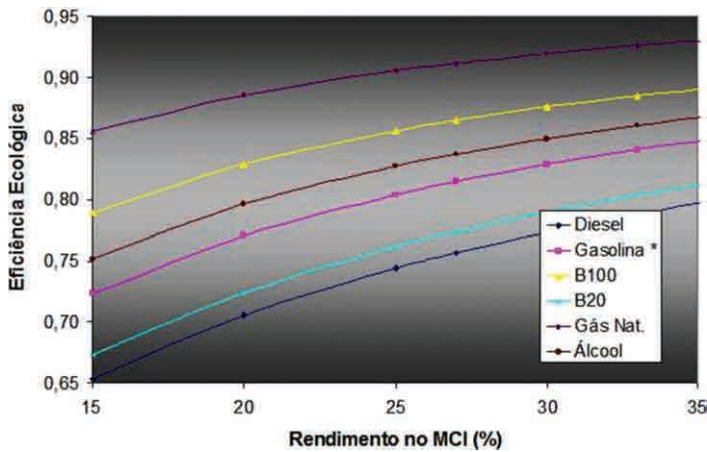


Gráfico 19.2 – Variação da eficiência ecológica em função do rendimento no MCI.

\* Gasolina com 25% de álcool etílico

Fonte: Coronado-Rodríguez et al. (2009)

## Conclusões

O uso de biodiesel puro (B100) ou uma mistura com diesel (B20) em motores de combustão interna, especialmente do tipo ignição por compressão, representa uma excelente opção do ponto de vista ecológico.

Os níveis de emissão em motores de combustão interna usando biodiesel puro (B100) são: 0,658 kg/kg de combustível para o CO<sub>2</sub>; 0,042 kg/kg de combustível para o NO<sub>x</sub> e 0,009931 kg/kg de combustível de material particulado MP.

No caso de usar 20% de biodiesel misturado com 80% diesel (B20) os níveis de emissão são: 2,61 kg/kg de combustível para o CO<sub>2</sub>; 0,024 kg/kg de combustível para o SO<sub>2</sub>; 0,0404 kg/kg de combustível para o NO<sub>x</sub> e 0,01421 kg/kg de combustível de material particulado MP.

O total de emissões para o diesel em comparação com o biodiesel (B100) é 4,4 vezes a mais, baseados na relação de kg/kg de combustível. Em termos de eficiências ecológicas, as características de um MCI usando diesel, biodiesel B100 e biodiesel B20 são respectivamente 77,34%, 87,58% e 78,94%, considerando uma eficiência térmica nos MCI de 30%. Os estudos mostram que o uso de biodiesel como combustível líquido, desde um ponto de vista ecológico quantitativo, é melhor que o diesel, apresentando os mais altos valores de eficiência ecológica.

## **Análise técnica e econômica de um gaseificador de biomassa integrado a um conjunto motor/gerador de 5 kWe de potência**

Procurando respostas para fornecimento de energia, este estudo apresenta ideias e dados para uma possível aplicação prática em comunidades isoladas, distantes da rede nacional de distribuição de energia elétrica. Os sistemas de gaseificação de biomassa têm sido utilizados há algum tempo e têm demonstrado ser uma boa opção como solução aos problemas energéticos.

A gaseificação da biomassa se apresenta como uma alternativa sustentável de produção de energia, com baixa produção poluente que permite certo equilíbrio entre consumo e produção de gás carbônico no ciclo global de crescimento e consumo de biomassa. A gaseificação consiste em um processo de conversão termoquímico no qual a biomassa é transformada em gás combustível (*syngas* ou gás pobre), por meio da oxidação parcial com ar, oxigênio ou vapor de água a altas temperaturas. O ar é preferencialmente

utilizado como agente de gaseificação (Sims, 2002). Foram desenvolvidos na Unesp de Guaratinguetá dois gaseificadores de leito fixo, tipo *downdraft* (concorrente).

Na Tabela 19.3, tem-se uma comparação entre alguns aspectos dos tipos de gaseificadores de leito fixo existentes (*downdraft* e *updraft*). A diferença principal entre os gaseificadores *updraft* e *downdraft* encontra-se no sentido do fluxo de gás. No caso do *downdraft*, o fluxo do gás coincide com o sentido do fluxo de alimentação da biomassa. Isso contribui para que exista uma ordem diferente nas zonas de reação de cima para baixo, ou seja, da parte mais alta para a mais baixa, na seguinte ordem: secagem, pirólise, oxidação e redução. A geração de alcatrão contida no *syngas* nos gaseificadores *downdraft* é baixa, comparada com os gaseificadores *updraft*. Alguns autores recomendam o PCI do *syngas* entre 4 MJ/Nm<sup>3</sup> a 6MJ/Nm<sup>3</sup> (Lora; Nogueira, 2003), utilizando ar como agente gaseificante; outros autores afirmam que o valor do PCI pode alcançar um valor próximo a 7MJ/Nm<sup>3</sup> (Sharma, 2008).

Tabela 19.3 – Comparação entre os gaseificadores *downdraft* e *updraft*

Tipo de Gaseificador	Temperatura (°C)		Fluxo de gás	Alimentação da biomassa	Agente de gaseificação	Conteúdo de alcatrão
	Reação	Saída do <i>syngas</i>				
<i>Updraft</i>	700-1000	250	Para cima, contracorrente com o sentido de alimentação da biomassa	Por cima do gaseificador	Por baixo do gaseificador	Alto
<i>Downdraft</i>	700-1000	800	Para baixo, concorrente com o sentido de alimentação da biomassa	Por cima do gaseificador	Por cima ou perto de uma certa altura acima da parte inferior do gaseificador	Baixo

Esforços têm sido realizados para a busca de uma alta eficiência nos sistemas de geração de energia de pequeno porte, incorporando sistemas de gaseificação de biomassa em motores de combustão interna (MCI), micro-turbinas a gás ou células a combustível (Seri/SP, 1988).



## Metodologia

### Descrição do sistema

Na Figura 19.1, apresenta-se um protótipo de gaseificação tipo *downdraft* construído no Laboratório de Otimização de Sistemas Energéticos (Lose), da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG), na Universidade Estadual Paulista (Unesp), financiado pelo CNPq, Projeto CTENRG, Processo n° 555072/2006-1. O sistema de gaseificação foi projetado para uma capacidade de processamento de biomassa de 15 kg/h a 30 kg/h integrado a um trocador de calor água-gás, um filtro de manga e um motor gerador marca Honda de 5 kWe de potência.



Figura 19.1 – Sistema de gaseificação de biomassa construído no Lose-FEG-Unesp.

A Figura 19.2 apresenta o desenho do sistema de geração de energia estudado neste trabalho. O eucalipto, cuja análise aparece na Tabela 19.4, entra pelo topo do gaseificador com 20% de umidade, passando posteriormente por um processo de secagem que acontece a uma temperatura aproximadamente de 200°C; uma vez que a temperatura supera os 400°C, inicia-se o processo de pirólise. Quando a temperatura alcança 700°C, têm

lugar as reações de gaseificação, que se dividem em reações heterogêneas (gás-sólido) e homogêneas (gás-gás), dando lugar à formação do *syngas*. Esse *syngas* tem como constituintes principais CO, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, vapor de água e hidrocarbonatos ou alcatrão. Sua composição varia com as características da biomassa, agente gaseificante e as condições do processo. Um fator determinante na composição química do gás é o conteúdo de umidade; se a biomassa apresenta um conteúdo de umidade elevado irá requerer maior quantidade de agente gaseificante no processo porque a água tem que se aquecer e evaporar.

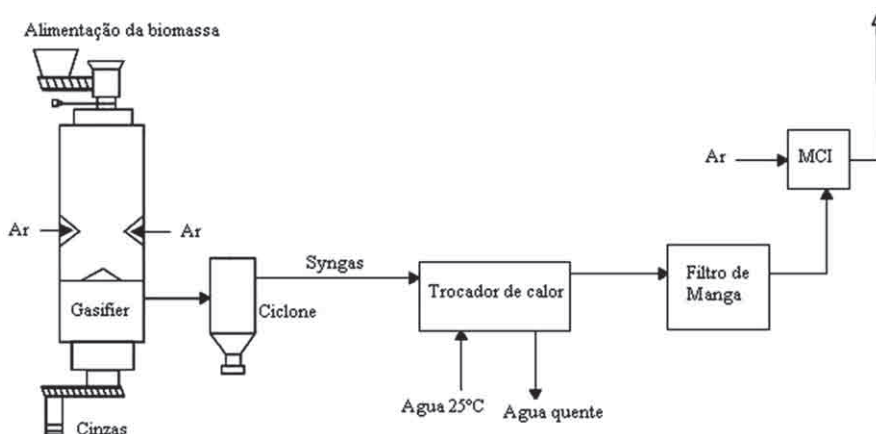


Figura 19.2 – Desenho do sistema de geração integrando um gaseificador de biomassa a um conjunto motor-gerador de 5 kW<sub>e</sub>.

Tabela 19.4 – Composição do eucalipto

Biomassa	C	H	N	S	O	Cinzas
Eucalipto	Percentagem em peso base seca					
	49	5,87	0,3	0,01	43,97	0,72
	Percentagem em peso base úmida					
	39,2	4,696	0,240	0,008	35,176	0,576

Vários autores têm trabalhado na estimativa da composição química do gás de biomassa (Sharma, 2008; Zainal et al., 2001; Jarungthammachote; Dutta, 2007; Mancebo-Boloy et al., 2008a). Os seguintes parâmetros foram assumidos: 20% de umidade do eucalipto (Jarungthammachote; Dut-

ta, 2007); relação ar-biomassa de 0,20 (Mancebo-Boloy et al., 2008a); valor que se encontra na faixa para a gaseificação (0,19-0,43) (Vian, 1991); temperatura de gaseificação de 800°C (Mancebo-Boloy et al., 2008a); composição química do *syngas* em base seca: CO<sub>2</sub> (9,28%), CO (27,28%), H<sub>2</sub> (27,25%), N<sub>2</sub> (35,26%) e CH<sub>4</sub> (0,92%) (ibidem); poder calorífico inferior de 6,71MJ/Nm<sup>3</sup> (ibidem); e massa específica de 1,30kg/Nm<sup>3</sup> (ibidem).

Após sair do gaseificador, o *syngas* passa por uma etapa de limpeza, que consta de vários sistemas como ciclone, trocador de calor água-gás e um filtro de manga. Dependendo da eficiência de remoção para a qual foi projetado, o ciclone elimina grande parte do material particulado contido no *syngas*. No trocador de calor, o *syngas* entra a 600°C de temperatura e se resfria a uma temperatura de 40°C gerando água quente em diversas temperaturas (40°C, 45°C, 50°C, 55°C e 60°C). Ali existe um purgador que tem como objetivo eliminar o condensado do *syngas* (alcatrão), o qual pode ser usado nas indústrias veterinária, farmacêutica e química, na fabricação de espumas de poliuretano, entre outras aplicações. Finalmente, o *syngas* passa por um filtro de manga onde se elimina o resto do material particulado para garantir as condições mínimas necessárias (Lora; Nogueira, 2003) (Tabela 19.5) que permitam seu posterior uso no conjunto motor-gerador Honda EP 5500, modelo GX 340 (Tabela 4 19.6) para a geração de eletricidade.

Tabela 19.5 – Qualidade do *syngas* para seu uso em sistemas de geração de energia (Lora; Nogueira, 2003)

Parâmetros	MCI	Turbina
Particulado(mg/Nm <sup>3</sup> )	50 (Máximo)	30 (Máximo)
Tamanho de particular (um)	10 (Máximo)	5 (Máximo)
Alcatrão (mg/Nm <sup>3</sup> )	100 (Máximo)	–
Metais alcalinos (mg/Nm <sup>3</sup> )	–	0,24

Tabela 19.6 – Características do conjunto motor-gerador

Marca	Modelo	Capacidade de combustível (l)	Ep (kW)	Temperatura do gás de saída (°C)	Combustível	Consumo de combustível (g/kWh)
Honda EP 5500	GX 340	17	5	450	Gasolina	474

## Simplificações e suposições

Pode-se efetuar o balanço de energia baseado na Primeira Lei da Termodinâmica, representada pela Equação (19.4), desprezando os efeitos da energia cinética e potencial. Para a determinação da eficiência do sistema foram considerados dois casos:

- Caso 1: a biomassa como energético principal para a produção de eletricidade e de água quente;
- Caso 2: o *syngas* como energético principal para a geração de água quente e eletricidade de forma independente.

$$Q_{vc} + \sum_{i=1}^n m_i \times h_i = W_{vc} + \sum_{o=1}^n m_o \times h_o \quad (19.4)$$

onde:

- $Q_{vc}$  – fluxo de calor no volume de controle;
- $m_i$  – fluxo de massa que entra no volume de controle;
- $W_{vc}$  – trabalho realizado no volume de controle;
- $h_i$  – entalpia de entrada;
- $m_o$  – fluxo de massa que sai do volume de controle;
- $h_o$  – entalpia de saída.

No conjunto motor-gerador marca Honda (Tabela 19.6) foi determinado o consumo mínimo de *syngas* requerido para gerar 5 kWe de potência nominal. Para o cálculo do consumo mínimo de *syngas* foi necessário assumir uma eficiência de 14% na geração de eletricidade (20% eficiência nominal do motor) pelo fato do *syngas* ter um poder calorífico inferior menor ao poder calorífico inferior da gasolina. A eficiência do gerador de eletricidade pode ser considerada 95%. A partir do consumo mínimo de *syngas* foram determinados o consumo de biomassa, fluxo real de *syngas* produzido e o consumo de ar do gaseificador (Tabela 19.9) (Bacaicoa et al., 1994).

No volume de controle considerado no gaseificador de biomassa foram determinados os seguintes fatores: entalpia do *syngas*, entalpia da biomassa, entalpia das cinzas, a perda de calor ao meio ambiente, a eficiência a frio do gaseificador, a capacidade calorífica do *syngas* e a energia térmica do *syngas*, conforme se mostra na Tabela 19.9.

No volume de controle considerado no trocador de calor água-gás foram determinados os seguintes parâmetros (Tabela 19.10): fluxo de água quente gerada (Gráfico 19.3) e energia térmica da água considerando várias eficiências do trocador de calor (80%, 75%, 70% e 65%) e várias temperaturas da água (40°C, 45°C, 50°C, 55°C e 60°C).

Para o estudo econômico foi determinado o custo do pessoal de operação, o custo de manutenção do gaseificador, o custo de geração de eletricidade de cada sistema avaliado (alocação de custos), o ganho de eletricidade e a receita anual esperada visando conhecer a viabilidade econômica do sistema.

No caso do gaseificador de biomassa foram determinados os custos de manutenção e de produção do *syngas*, considerando que a manutenção do gaseificador irá se realizar a cada 1.250 h/ano (3,47 h/d) de operação do equipamento e um custo de eucalipto de 0,0038US\$/kWh baseado em um preço de 20US\$/t (Mancebo-Boloy et al., 2008b), respectivamente, o custo de investimento do gaseificador, o tempo de utilização, a energia suprida pela biomassa e o fator de anuidade.

No caso do trocador de calor, o custo de geração de água quente foi determinado considerando o custo de investimento, a energia térmica gerada, o tempo de utilização, o fator de anuidade e o fator de ponderação de água quente para o trocador de calor. Finalmente, no conjunto motor-gerador foi determinado o custo de geração de eletricidade considerando o investimento inicial, a potência elétrica gerada, o tempo de utilização, o fator de anuidade e o fator de ponderação de eletricidade.

A receita anual esperada foi determinada a partir dos ganhos de produção de energia térmica (água quente) e de eletricidade; considerou-se que não existe um excedente de geração de energia elétrica. Na análise também foi considerada uma tarifa de venda de eletricidade de 0,10US\$/kWh (EDP Bandeirante, 2008) para as comunidades isoladas; por último, a tarifa de geração de água quente considerada foi 0,0022US\$/kWh (Kong et al., 2004).

Todos os resultados obtidos na análise econômica foram apresentados em forma de gráficos como se mostram nos Gráficos 19.4 e 19.5.

Nas Tabelas 19.7 e 19.8, são apresentados os valores assumidos para a análise energética e econômica realizada no sistema.

Tabela 19.7 – Valores constantes assumidos no sistema

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
Condições normais de pressão e temperatura	P = 101.325Pa, T = 25°C	Período de utilização	2.000h/ano, 3.000h/ano, 4.000h/ano, 5.000h/ano, 6.000h/ano
Temperatura de água quente	40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C	Investimento capital do trocador de calor	700US\$
Eficiência do trocador de calor	80%, 75%, 70%, 65%	Investimento capital do gaseificador de biomassa (Grupo..., 2008)	10.000,00US\$
Capacidade calorífica da água	4,19kJ/kg.K	Custo de manutenção do conjunto motor-gerador (Wu; Wang, 2006)	0,011US\$/kWh <sub>e</sub>
Investimento capital do conjunto motor/gerador [13]	1.437,02US\$	Custo de manutenção do trocador de calor	0,003US\$/kWh
Taxa anual de juros	4%, 8%, 12%	PCI da biomassa (Mancebo-Boloy et al., 2008)	19.457kJ/kg

Tabela 19.8 – Capacidades caloríficas (constantes A, B, C e D refere-se a coeficientes empíricos) (Zainal et al., 2001)

Espécies químicas	Tmax	A	10°B	10°C	10°D	Cp (kJ/kmolK)	Dh (kJ/kmol)	dH (kJ/kmol)
CH <sub>4</sub>	1.500	1,702	0,009081	-0,00000216		56,55	43.821,29	-30.696,07
H <sub>2</sub>	3.000	3,249	0,000422	-	8.300	29,63	22.961,31	22.962,69
CO	2.500	3,376	0,000557	-	-3.100	31,16	24.146,13	-86.377,42
CO <sub>2</sub>	2.000	5,457	0,001047	-	-115.700	48,33	37.448,84	-356.057,91
N <sub>2</sub>	2.000	3,28	0,000593	-	4.000	30,75	23.829,66	23.831,09
H <sub>2</sub> O	2.000	3,47	0,00145	-	12.100	37,43	29.001,74	-212.814,51
C	2.000	1,771	0,000771	-	-86.700	16,87	13.068,25	-

## Análise energética do sistema

A análise energética realizada considerou os dois casos de estudo mencionados no item anterior (Simplificações e suposições): para o Caso 1, a eficiência do sistema foi calculada utilizando a Equação (19.6); para o Caso 2, as eficiências de geração de eletricidade e geração de água quente foram determinadas respectivamente pelas Equações (19.5) e (19.8). A energia térmica da água foi calculada pela Equação (19.7) que permitiu calcular pela

Equação (19.9) o fluxo de água quente gerado pelo trocador para diferentes temperaturas de saída da água (40°C, 45°C, 50°C, 55°C e 60°C). Por último, a energia suprida pelo *syngas* foi determinada pela Equação (19.10).

$$\eta_{EP} = \frac{EP}{E_{SSyngas}} \quad (19.5)$$

$$\eta_S = \frac{EP + E_{HW}}{E_W} \quad (19.6)$$

$$E_{HW} = E_{Syngas} \times \eta_{HE} \quad (19.7)$$

$$\eta_{HW} = \frac{E_{HW}}{E_W} \quad (19.8)$$

$$m_{H_2O} = \frac{\eta_{HE} \times E_{Syngas}}{cp_{H_2O} \times (T_O - T_I)} \quad (19.9)$$

$$E_{SSyngas} = \frac{EP}{0,95 \times 0,14} \quad (19.10)$$

Usando as Equações (19.11) e (19.12), foram determinados a energia térmica e a capacidade calorífica do *syngas*. As Equações (19.13) a (19.18) permitiram conhecer o volume de gases, o volume teórico dos gases triatômicos, nitrogênio e vapor de água contido no gás de síntese; por último, foi avaliado o volume teórico de ar do processo de gaseificação (Lora; Nogueira, 2003). As entalpias de formação da biomassa, das cinzas e do *syngas* foram calculadas pelas Equações (19.19) a (19.22). Finalmente, pela Equação (19.23), foi determinada a eficiência a frio do gaseificador (Fryda et al., 2008), desprezando o calor sensível do gás e as cinzas produzidas.

$$E_{Syngas} = \frac{m_{Syngas} \times cp_{Syngas} \times (T_{SO} - T_{SI})}{3600} \quad (19.11)$$

$$cp_{Syngas} = \frac{\sum_{i=element}^n cp_i}{6 \times 24,034} \quad (19.12)$$

$$V_g = V_g^0 + (1,0161 \times (ER - 1) \times V_{air}) \quad (19.13)$$

$$V_g^0 = RO_2 + N_2 + H_2O \quad (19.14)$$

$$RO_2 = 0,01866 \times (C^w + 0,375 \times S^w) \quad (19.15)$$

$$N_2 = (0,79 \times m_{ar}) + (0,0008 \times N^w) \quad (19.16)$$

$$H_2O = 0,111 \times H^w + 0,0124 \times C^w + 0,0161 \times m_{ar}^0 \quad (19.17)$$

$$V_{air}^0 = 0,0889 \times (C^w + 0,375 \times S^w) + (0,265 \times H^w) - (0,6333 \times O^w) \quad (19.18)$$

$$h_{fb} = (PCI_b \times 1000) + \left( \sum_{i=prod}^n n_k \times (h_f^{-0})_i \right) \quad (19.19)$$

$$h_b = ((1 - MC) \times h_{fb}) + (MC \times \left( \frac{dH_{H_2O}}{24,03} \right)) \quad (19.20)$$

$$h_{cinzas} = \frac{Dh}{24,28} \quad (19.21)$$

$$h_{syngas} = \frac{\sum_{e=elemento} C_e dH_e}{100 \times 24,03} \quad (19.22)$$

$$\eta_{cg} = \frac{PCI_{syngas}}{PCI_b} \quad (19.23)$$

Os resultados da análise são apresentados na Tabela 19.9.

## Análise econômica do sistema

Baseado na metodologia de análise econômica para alocação de custos (Silveira, 1990; Silveira et al., 2001; Villela; Silveira, 2005; Silveira et al., 2007; Lamas et al., 2009; Silveira et al., 2009), a viabilidade econômica do sistema depende diretamente dos custos produzidos pelos sistemas: conjunto motor-gerador, gaseificador de biomassa e trocador de calor. As expressões para determinar esses custos se descrevem nas Equações (19.24) a (9.36).

$$Ew = \frac{m_b \times PCI_b \times 1000}{3600} \quad (19.24)$$

$$C_{Operação} = \frac{\text{Índice Salarial} \times \text{Horas de operação}}{EP_{Gaseificador} \times H} \quad (19.25)$$



$$CM_{\text{Gaseificador}} = \frac{\text{Componente} + H}{EP_{\text{Gaseificador}} \times \text{Intervalomanutenção}} \quad (19.26)$$

$$C_{\text{Syngas}} = \frac{I_{\text{Gaseificador}} \times f}{H \times E_{\text{SSyngas}}} + \frac{C_b \times E_w}{E_{\text{SSyngas}}} + CM_{\text{Gaseificador}} + C_{\text{Operação}} \quad (19.27)$$

$$C_{EL} = \frac{I_{EG} \times f}{H \times EP} + \frac{C_{\text{Syngas}} \times FP_E}{EP} + CM_{EG} + C_{\text{Operação}} \quad (19.28)$$

$$C_{HW} = \frac{I_{HE} \times f}{H \times E_{HW}} + \frac{C_{\text{Syngas}} \times FP_{HW}}{E_{HW}} + CM_{HE} + C_{\text{Operação}} \quad (19.29)$$

$$FP_E = \frac{EP}{EP + E_{HW}} \quad (19.30)$$

$$FP_{HW} = \frac{E_{HW}}{EP + E_{HW}} \quad (19.31)$$

$$f = \frac{q^k \times (q-1)}{(q^k - 1)} \quad (19.32)$$

$$q = 1 + \frac{r}{100} \quad (19.33)$$

$$GPEL = EP \times H \times (P_{EL} - C_{EL}) \quad (19.34)$$

$$GPHW = EP_{HW} \times H \times (P_{HW} - C_{HW}) \quad (19.35)$$

$$R = GPEL + GPHW \quad (19.36)$$

O custo do pessoal de operação foi calculado por meio da Equação (19.25), considerando que o gaseificador irá ser operado por três funcionários, onde cada funcionário tem uma renda salarial de 631,58 US\$/mês, o índice salarial em [US\$/h] foi 3,79, cujo valor foi determinado considerando o tempo de operação do gaseificador, cujo valor por dia está entre 5,6 h/d e 16,7 h/d tomando como referência um período total de operação de 2.000 h/ano até 6.000 h/ano.

O custo de manutenção do gaseificador foi calculado pela Equação (19.26), considerando que a manutenção do gaseificador irá se realizar a cada 3,47 h/d de operação do equipamento.

## Resultados e discussão

### Resultados obtidos da análise energética no sistema

Do balanço de energia realizado nos volumes de controles considerados no gaseificador, no conjunto motor-gerador e trocador de calor, obtêm-se os seguintes resultados: o fluxo de *syngas* gerado pelo gaseificador foi de 49,88 Nm<sup>3</sup>/h (Bacaicoa et al., 1994) com um consumo de biomassa de 15 kg/h (ibidem), o PCI do *syngas* em base seca foi de 6,71MJ/Nm<sup>3</sup> a 600°C de temperatura. No estudo do caso, a eficiência do sistema alcançou valores na faixa de 13,83% até 12,39%, considerando as diferentes eficiências do trocador de calor (80% - 65%). Na Tabela 19.9 se apresentam todos esses valores, incluindo potência suprida pela biomassa, eficiência a frio do gaseificador, potência suprida pelo *syngas*, energia e entalpia do *syngas*, capacidade calorífica do *syngas*, fluxo de ar, gás de biomassa, gás teórico para a gaseificação, entalpia de formação de biomassa, entalpia da biomassa, entalpia das cinzas geradas pelo gaseificador e as perdas de calor ao meio ambiente.

Tabela 19.9 – Resultados obtidos da análise energética no sistema

Parâmetros	Valor
Potência suprida pela biomassa	81,07 kW
Eficiência a frio do gaseificador	47,20%
Fluxo de ar (Bacaicoa et al. 1994)	48,10 Nm <sup>3</sup> ar/h
Potencia suprida pelo <i>syngas</i>	37,59 kW
Energia térmica do <i>syngas</i>	7,77kW
Capacidade calorífica do <i>syngas</i>	1,56 J/kg.K
Perdas de calor ao meio ambiente gerada pelo gaseificador	39,90 kW
Ar teórico para o processo de gaseificação	3,56 Nm <sup>3</sup> ar/kgb
Fluxo de <i>syngas</i> (Bacaicoa et al. 1994)	49,88 Nm <sup>3</sup> gas/h
Fluxo de gás de biomassa	1,23 Nm <sup>3</sup> gas/kgb
Entalpia de formação da biomassa	9267,99 kJ/kg
Entalpia da biomassa	5396,96 kJ/kg
Entalpia das cinzas	538,28 kJ/kg
Entalpia do <i>syngas</i>	1757,93kJ/kg

Tabela 19.10 – Balanço de energia no trocador de calor

Parâmetros	Resultados			
	Eficiência do trocador de calor (%)	80	75	70
<b>Caso 1</b>				
Eficiência do sistema (%)	13,83	13,35	12,87	12,39
<b>Caso 2</b>				
Eficiência de geração de água quente (%)	7,66	7,19	6,71	6,23
Eficiência de geração de eletricidade (%)	13,30			
<b>Caso 1 e 2</b>				
Energia térmica da água (kW)	6,21	5,83	5,44	5,05

A Tabela 19.10 mostra que a eficiência do sistema, a eficiência de geração de água quente e a energia térmica da produção de água quente decrescem para pequenos valores de eficiência do trocador de calor, uma possível explicação a esse fato pode ser que a energia térmica útil do *syngas* permanece com valores altos até o *syngas* abandonar o trocador de calor.

O Gráfico 19.3 mostra o fluxo de água quente gerado pelo trocador de calor em razão da temperatura de saída da água quente no trocador de calor. Pode-se observar que para altos valores de temperatura de saída da água o fluxo de água quente gerado pelo trocador diminui pelo fato de o trocador de calor operar com menores valores de eficiência, pois a energia térmica útil do *syngas* permanece com valores altos até o *syngas* abandonar o trocador de calor.

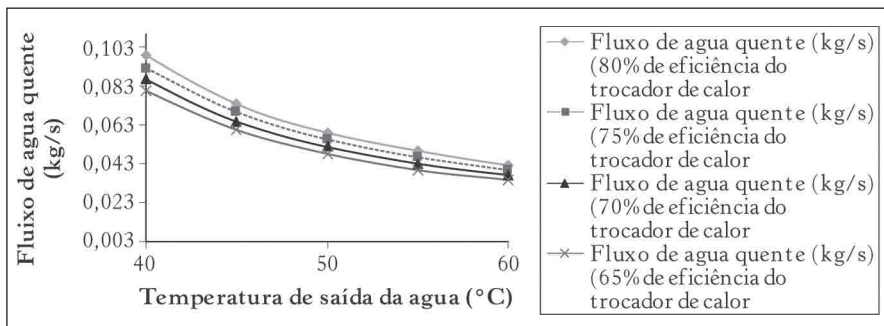


Gráfico 19.3 – Fluxo de água quente versus temperatura de saída da água no trocador de calor.

### Resultados da análise econômica no sistema

Tabela 19.11 – Custos de manutenção e operação gerados pelo funcionamento do gaseificador

Custos	2.000 h/ano	3.000 h/ano	4.000 h/ano	5.000 h/ano	6.000 h/ano
Manutenção	0,01377- 0,00909	0,01074- 0,00606	0,00923- 0,00455	0,00832- 0,00364	0,00771- 0,00303
Operação	0,00057	0,000253	0,000142	0,000091	0,000063
Total	0,012	0,009	0,007	0,006	0,005

O custo total de manutenção e operação do gaseificador variou desde 0,012US\$/kWh até 0,005US\$/kWh durante o período de utilização do equipamento; esse valor encontra-se na faixa de valor verificado na literatura (Seri/SP, 1988).

O Gráfico 19.4 apresenta a variação dos custos de *syngas* em razão do período de utilização. Pode-se observar que todos os custos calculados para cada período de utilização decrescem com o incremento do período de amortização. A partir de um período de utilização igual a 4.000 h/ano e um período de amortização igual a quatro anos, os custos do *syngas* apresentam pouca variabilidade.

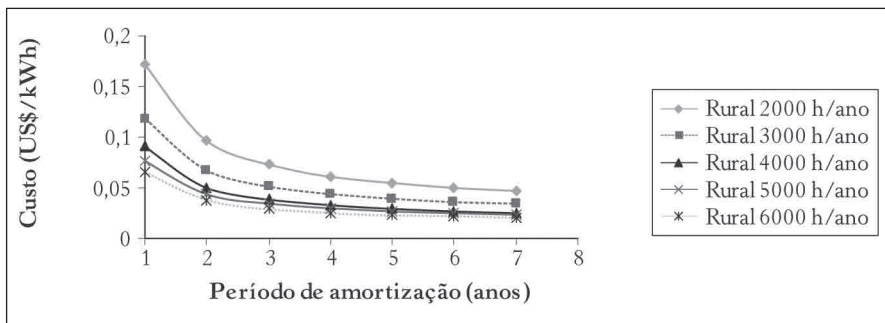


Gráfico 19.4 – Custos de *syngas* em razão do período de utilização.

O Gráfico 19.5 apresenta a variação dos custos de eletricidade gerados em razão do período de utilização do sistema. Considerando o preço do eucalipto (Tabela 19.7), uma taxa de juros de 12%, pode-se observar que todos os custos calculados para cada período de utilização do sistema decrescem gradualmente com o aumento do período de amortização; pode-se observar que no caso do custo de geração de eletricidade para um período

de utilização de 2.000 h/ano e um período de amortização de quatro anos, o sistema alcançará valores inferiores comparado com a tarifa de venda de eletricidade. Pelo contrário, para um período de utilização de 6.000 h/ano e um período de amortização de um ano, o sistema alcançará valores menores em relação à tarifa de venda de eletricidade.

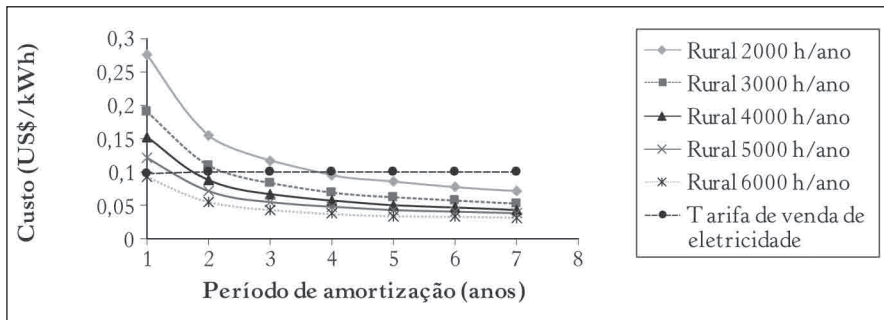


Gráfico 19.5 – Custos de eletricidade em função do período de utilização.

O Gráfico 19.6 apresenta a variação do custo de geração de água quente em razão do período de amortização. Pode-se observar que todos os custos calculados para cada período de utilização decrescem gradualmente com o incremento do período de amortização. Pode-se destacar que em todos os períodos de utilização do sistema avaliados, a geração de água quente para uso doméstico comparado com a tarifa de venda de água quente (0,0022US\$/kWh) (Kong et al., 2004) não alcançou valores inferiores, pelo que se pode concluir que o sistema não produz água quente com preços competitivos no mercado.

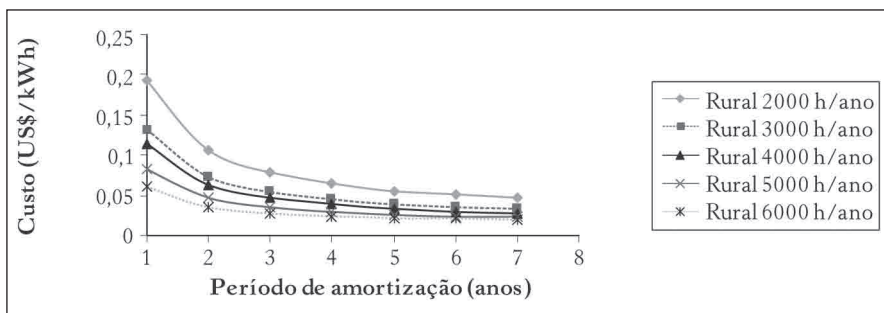


Gráfico 19.6 – Custos de geração de água quente em função do período de utilização.

No Gráfico 19.7 pode-se observar a variação da receita anual esperada *versus* período de amortização, a qual aumenta gradualmente com o aumento do período de amortização. A viabilidade econômica calculada para o sistema começa a partir de um período de amortização maior a um ano e meio, considerando um período de utilização de 6.000 h/ano. Nessas condições, os operários precisariam trabalhar aproximadamente 17 h/d, algo muito difícil de se conseguir para o uso desses sistemas em comunidades isoladas. No caso de considerar um período de utilização de 3.000 h/ano, os operários trabalhariam aproximadamente 8 h/d, um período ótimo para o uso dessa tecnologia em pequenas comunidades isoladas. Com esses resultados, pode-se concluir que a aplicação dessa tecnologia em comunidades isoladas é viável para um período de utilização de 3.000 h/ano, garantindo um período de amortização igual a quatro anos, valor de acordo ao encontrado na literatura (Coronado-Rodríguez, 2006).

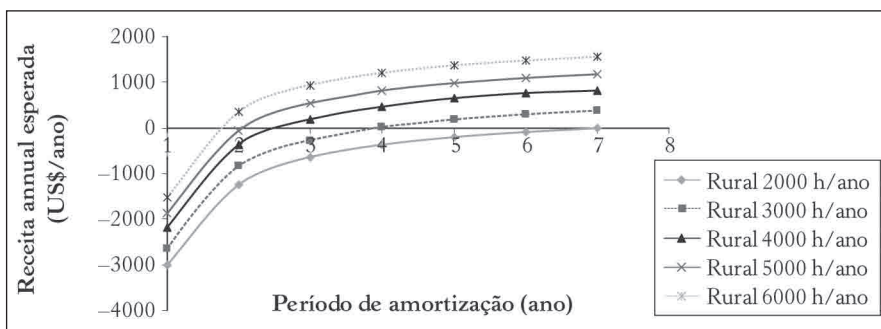


Gráfico 19.7 – Viabilidade econômica do sistema para comunidades isoladas.

## Conclusões

O sistema de gaseificação de biomassa utilizando ar como agente gaseificante integrado a um conjunto motor-gerador para geração de energia elétrica em pequeno porte foi avaliado técnica e economicamente, visando à sua possível instalação em comunidades isoladas. Desde o ponto de vista energético, a eficiência do sistema variou de 13,83% até 12,39% para o Caso 1, sendo seu valor médio de 13,16%, resultado de acordo com o reportado na literatura para esses casos, 13% (Lora et al., 2004).

Para o Caso 2, a eficiência de geração de água quente foi calculada variando de 7,66% a 6,23% e a eficiência de geração de eletricidade foi de 13,3%. Em ambos os casos, a energia térmica da geração de água quente variou na faixa de 6,21 kW a 5,05 kW. A eficiência a frio do gaseificador foi de 47,2%.

Esses resultados transformam o sistema em uma tecnologia atrativa e viável tecnicamente para ser aplicada em comunidades isoladas. Além disso, essa tecnologia apresenta emissões baixas de poluentes em comparação com outras tecnologias de combustão que trabalham com óleo diesel mineral. A análise econômica permitiu, por meio da alocação dos custos gerados por cada sistema, a determinação da viabilidade. O estudo mostra que o sistema é totalmente viável para um período de amortização igual a quatro anos, considerando uma taxa anual de 12% de juros (Gráfico 19.5) e um custo total de capital investido de US\$ 16.991,83.

## Referências bibliográficas

- BACAICOA, P. G. et al. Scale-up of downdraft moving bed gasifiers (25-300kg/h): design, experimental aspects and results. *Bioresource Technology*, v.48, p.229-35, 1994.
- CARDU, M.; BAICA, M. Regarding a global methodology to estimative the energy ecologic efficiency of thermopower plants. *Energy Conversion and Management*, v.40, p.71-87, 1999a.
- . Regarding a new variant methodology to estimative globally the ecologic impact of thermopowers plants. *Energy Conversion and Management*, v.40, p.1569-75, 1999b.
- . A seismic vision regarding a methodology to estimative globally the energy: ecologic efficiency of thermopower plants. *Energy Conversion and Management*, v.42, p.1317-25, 2001.
- COLLMUS, D.; FREIBERGER, J. J. *Gasoline consumption of a Highly Throttled Multi-Cylindered Engine*. Cambridge: Thesis MIT library, June 1945.
- COMGAS. *Composição do gás natural*. 2010. Disponível em: <[http://www.comgas.com.br/conheca\\_sociedade/escola/composicao.asp](http://www.comgas.com.br/conheca_sociedade/escola/composicao.asp)>. Acesso em: 15 maio 2010.
- CORONADO-RODRÍGUEZ, C. J. *Análise técnica-econômica de um gaseificador de biomassa de 100kg/h para acionamento de um motor de combustão interna*. 2006. 195f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Guaratinguetá, 2006.
- CORONADO-RODRÍGUEZ, C. J. et al. Determination of ecological efficiency in internal combustion engines: the use of biodiesel. *Applied Thermal Engineering*, v.29, n.10, p.1887-92, 2009.

- EDP BANDEIRANTE. Tarifa de venda de eletricidade. [Online]. 2008. Disponível em: <[http://www.bandeirante.com.br/energia/utilidades/informacoes\\_comerciais/pdf/Tarifas\\_Fornecimento\\_Energia\\_Eletrica\\_outubro\\_2008\\_completa\\_grupo\\_A\\_B.pdf](http://www.bandeirante.com.br/energia/utilidades/informacoes_comerciais/pdf/Tarifas_Fornecimento_Energia_Eletrica_outubro_2008_completa_grupo_A_B.pdf)>. Acesso em: 18 jun. 2008.
- FRYDA, L. et al. Integrated CHP with autothermal biomass gasification and SOFC-MGT. *Energy Conversion and Management*, v.49, p.281-90, 2008.
- GOTO, Y.; NARUSAWA, K. Combustion stabilization of a spark ignition natural gas engine. *JSAE Review*, v.17, p.251-8, 1996.
- GRUPO DE OTIMIZAÇÃO DE SISTEMAS ENERGÉTICOS. Projeto CTNERG, processo 555072/2006-1. Guaratinguetá: Universidade Estadual Paulista, 2008.
- HEYWOOD, J. B. *Internal combustion engine fundamentals*. New York: McGraw-Hill, 1988.
- JARUNGTAMMACHOTE, S.; DUTTA, A. Thermodynamic equilibrium model and second law analysis of a downdraft waste gasifier. *Energy*, v.32, p.1660-9, 2007.
- KONG, X. Q. et al. Energy efficiency and economic feasibility of CCHP driven by stirling engine. *Energy Conversion and Management*, v.45, p.1433-42, 2004.
- LAMAS, W. Q. et al. Development of a methodology for cost determination of wastewater treatment based on functional diagram. *Applied Thermal Engineering*, v.29, p.2061-71, 2009.
- LORA, E. E. S. et al. Geração elétrica em pequena escala a partir da gaseificação de biomassa. In: AGRENER 2004 CONGRESS. Proceedings of... Campinas, São Paulo, 2004.
- LORA, E. E. S.; NOGUEIRA, L. A. H. *Dendroenergia: fundamentos e aplicações*. 2.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- MANCEBO-BOLOY, R. A. et al. Prediction of hydrogen production of a downdraft gasifier using equilibrium modeling for different moisture content for solid oxid fuel cell action (sofc). In: THE IBEROAMERICAN WORKSHOP ON HYDROGEN AND FUEL CELL. Proceedings... Ubatuba, São Paulo, 2008a.
- . Technical and economical analysis of biomass integrated gasifier/combined cycle power. In: 12th BRAZILIAN CONGRESS OF THERMAL SCIENCES AND ENGINEERING. Proceedings... Belo Horizonte, UFMG, 2008b. p.121-31.
- PATRAKHALTSEV, N. et al. *Toxicidad en motores de combustión interna*. Moscou: Universidad Rusa de la Amistad de los Pueblos, 1993.
- SALOMON, K. R. *Avaliação quantitativa do impacto ambiental das emissões gasosas e do uso da água de resfriamento em instalações de geração termelétrica*. 2003. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia, Universidade Federal de Itajubá. Itajubá, 2003.
- SERI/SP. *Handbook of biomass downdraft gasifier engine systems*. SERI/SP-271-3022 DE 88001135, March 1988.
- SHARMA, A. K. Equilibrium modeling of global reduction reactions for a downdraft (biomass) gasifier. *Energy Conversion and Management*, v.49, p.832-842, 2008.
- SILVEIRA, J. L. *Estudo de sistema de geração aplicado a fabricação de papel e celulose*. 1990. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Escola Federal de Engenharia de Itajubá. Itajubá, 1990.



- SILVEIRA, J. L. et al. Analysis of a molten carbonate fuel cell: cogeneration to produce electricity and cold water. *Energy*, v.26, p.891-904, 2001.
- . Combined cycle versus one thousand diesel power plants: pollutant emissions, ecological efficiency and economic analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.11, p.524-35, 2007.
- . The benefits of ethanol use for hydrogen production in urban transportation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.13, n.9, p.2525-34, 2009.
- SIMS, R. E. H. *The brilliance of bioenergy in business and practice*. London: James & James, 2002. v.I.
- TAYLOR, C. F. *The internal-combustion engine in theory and practice: combustion, fuels, materials, design*. Cambridge, MA: Ed. Massachusetts Institute of Technology, 1985.
- VIAN, O. A. *El pronóstico económico en química industrial*. Madrid: Ediciones de la Universidad Complutense S. A., 1991.
- VILLELA, I. A. C.; SILVEIRA, J. L. Thermoeconomic analysis applied in cold water production system using biogas combustion. *Applied Thermal Engineering*, v.25, p.1141-52, 2005.
- . Ecological efficiency in thermoelectrical power plants. *Applied Thermal Engineering*, v.27, p.840-7, 2007.
- WU, D. W.; WANG, R. Z. Combined cooling, heating and power: a review. *Progress in Energy and Combustion Science*, v.32, p.459-95, 2006.
- ZAINAL, Z. A. et al. Prediction of performance of a downdraft gasifier using equilibrium modeling for different biomass materials. *Energy Conversion and Management*, v.42, p.1499-515, 2001.

## Aspectos do incremento da cogeração no setor sucroalcooleiro com o uso de novos equipamentos e tecnologias para melhor aproveitamento energético

*Ricardo Alan V. Ramos, Rodnei Passolongo,  
Marcelo C. Fiomari, Ricardo A. Romão Júnior,  
Emanuel R. Woiski, Cassio Roberto M. Maia<sup>1</sup>*

### Introdução

O tema abordado neste capítulo é a cogeração de energia no setor sucroalcooleiro, com ênfase na utilização de novos equipamentos e tecnologias para melhor aproveitamento energético e consequente produção de um maior excedente de energia elétrica para comercialização.

Dentro desse contexto, são considerados o efeito do aumento dos níveis de pressão e temperatura do vapor, pela utilização de caldeiras e turbinas mais modernas e eficientes, bem como a eletrificação das moendas, o aproveitamento da palha, quer para queima em caldeira, quer para gaseificação, além do aproveitamento da vinhaça, mediante a biodigestão e posterior gaseificação.

Inicialmente é feita uma abordagem do setor sucroalcooleiro no Brasil e de sua inserção nas matrizes energética e elétrica brasileira, bem como do potencial do crescimento da cogeração, destacando-se as vantagens, perspectivas de expansão, tecnologias disponíveis, fatores importantes e incentivos para aumento da produção de bioeletricidade.

---

<sup>1</sup> Os autores agradecem à Usina Pioneiros Bioenergia S.A. de Sud Mennucci (SP) o fornecimento de dados de sua planta térmica e de potência utilizados nos estudos realizados. Os autores também são gratos à Fapesp pelo financiamento de um projeto de pesquisa mais amplo, no qual estão inseridos os temas abordados, bem como pelo fornecimento de bolsa de estudo de mestrado.

Na sequência, são apresentados os conceitos termodinâmicos e as definições de eficiências para os equipamentos e para a planta térmica e de potência como um todo, como também os índices desempenho e parâmetros importantes de operação no setor sucroalcooleiro. Além disso, é apresentado ainda um modelo de análise termoeconômica de sistemas de cogeração, considerando a teoria do custo exergético, bem como alguns conceitos da análise econômica desses sistemas, considerando as técnicas do Valor Presente Líquido (VPL) e da Taxa Interna de Retorno (TIR).

Após todas essas considerações e formulações, são apresentados exemplos de aplicação de alguns estudos desenvolvidos no setor sucroalcooleiro no âmbito do Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen) do Departamento de Engenharia Mecânica da Unesp de Ilha Solteira, os quais serviram ou servirão de base para implantação de novos projetos ou melhoria da eficiência dos projetos existentes.

Por fim, são apresentadas algumas considerações finais, bem como algumas possibilidades para estudos futuros, além de uma lista com as referências bibliográficas utilizadas.

## **Aspectos do setor sucroalcooleiro no Brasil**

O Gráfico 20.1 mostra evolução da produção de cana desde a safra 1994/1995 até a safra 2009/2010, a partir de dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Unica, 2010). Nota-se que a partir do ano 2000, a produção de cana vem crescendo no Brasil a uma taxa anual de aproximadamente 35 milhões de toneladas de cana.

O processo de colheita da cana pode ser realizado manualmente ou por meio de colhedoras mecânicas. O sistema tradicional de colheita, ainda utilizado na maioria das áreas cultivadas com cana-de-açúcar no Brasil, envolve a queima prévia do canavial e o corte manual da cana inteira. Entretanto, esse procedimento aos poucos vem sendo substituído pela colheita mecanizada da cana crua picada, sem queima, por conta de restrições ambientais à prática da queima.

Na Figura 20.1 é apresentado o fluxograma desde a colheita da cana até os processos de produção do etanol e do açúcar, bem como de alguns subprodutos do setor.

Cana (milhões de ton)

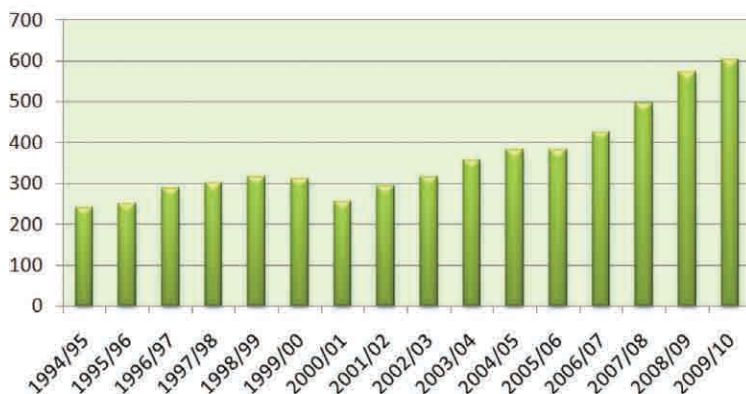


Gráfico 20.1 – Evolução da produção total de cana no Brasil

Fonte: Unica (2010)

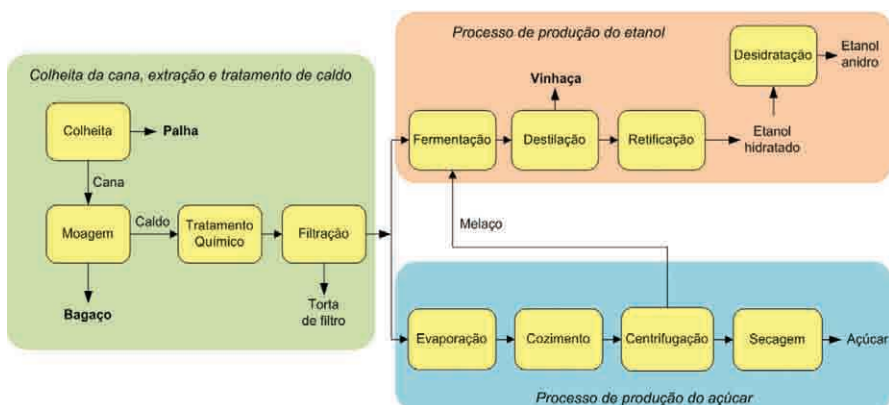


Figura 20.1 – Fluxograma de produção do álcool e do açúcar

Considerando o processo com um todo, desde a colheita até a produção de álcool e açúcar, existem vários resíduos, tais como a palha, que podem ser separados durante a colheita mecanizada; o bagaço, resultante do processo de moagem; a torta de filtro, proveniente da decantação e filtração do caldo; a vinhaça, obtida durante a fabricação do álcool; e, também, as cinzas resultantes do processo de queima na caldeira. Tais resíduos são valorizados e alguns deles podem ser reciclados e utilizados como fertilizantes, devolvendo ao solo parte dos nutrientes absorvidos e reduzindo a quantidade de adubos para tratamento do solo.

A fabricação do álcool e do açúcar apresenta uma grande demanda de energia térmica, uma vez que é necessário evaporar a água adicionada ao caldo durante o processo de embebição. Além disso, os processos de destilação e desidratação, para fabricação do etanol hidratado e anidro, também requerem energia térmica. Essa demanda de energia pode ser suprida por um sistema de produção combinada de calor e potência, denominado *sistema de cogeração*, o qual tradicionalmente utiliza o bagaço da usina como combustível. Pelo fato de serem obtidos dois produtos de valores distintos (energia térmica e potência) utilizando uma mesma fonte de energia, os sistemas de cogeração tornam-se atrativos por apresentarem eficiências de primeira lei maiores do que aquelas encontradas quando ambas as formas de energia são produzidas em processos independentes (Walter, 1994).

## **A cogeração no setor elétrico brasileiro**

Nos últimos anos, o setor elétrico brasileiro sofreu mudanças estruturais inovadoras, de ordem institucional e em nível de regulamentação, que alteraram sensivelmente o panorama, até então estável e controlado pelo governo, para um ambiente competitivo.

Dentro desse contexto, em 1996 foi criada a Agência Nacional de Energia Elétrica (Aneel) com o objetivo de regular e fiscalizar geração, transmissão, distribuição e comercialização da energia elétrica. Posteriormente, em 1998 foram criados o Operador Nacional do Sistema Elétrico (ONS), responsável pelo controle e operação das instalações de geração e transmissão de energia elétrica, e o Mercado Atacadista de Energia (MAE), responsável pelas transações de compra e venda de energia elétrica.

No início de 2000, foi instituído o Programa Prioritário de Termelétricidade (PPT), visando à implantação de usinas termelétricas e centrais de cogeração a gás natural, e, posteriormente, em 2002, foi criado o Programa de Incentivos às Fontes Alternativas de Energia Elétrica (Proinfa), permitindo a contratação de energia produzida por fontes alternativas renováveis (eólica, biomassa e pequenas centrais hidrelétricas).

Em 2004, foi criada a Empresa de Pesquisa Energética (EPE), com a finalidade de realizar estudos e pesquisas para subsidiar o planejamento do

setor energético, e a Câmara Central de Energia Elétrica (CCEE), com o objetivo de viabilizar a comercialização de energia elétrica no Sistema Integrado Nacional.

Por fim, no ano 2005, entrou em vigor o Protocolo de Kyoto, permitindo a comercialização de créditos de carbono oriundos, dentre outras fontes, da cogeração.

O Gráfico 20.2 mostra a distribuição das várias fontes de energia que constituem as matrizes energética e elétrica brasileira, segundo dados do Balanço Energético Nacional referente ao ano 2009 efetuado pelo Ministério de Minas e Energia (MME) e pela Empresa de Pesquisa Energética (EPE, 2010).

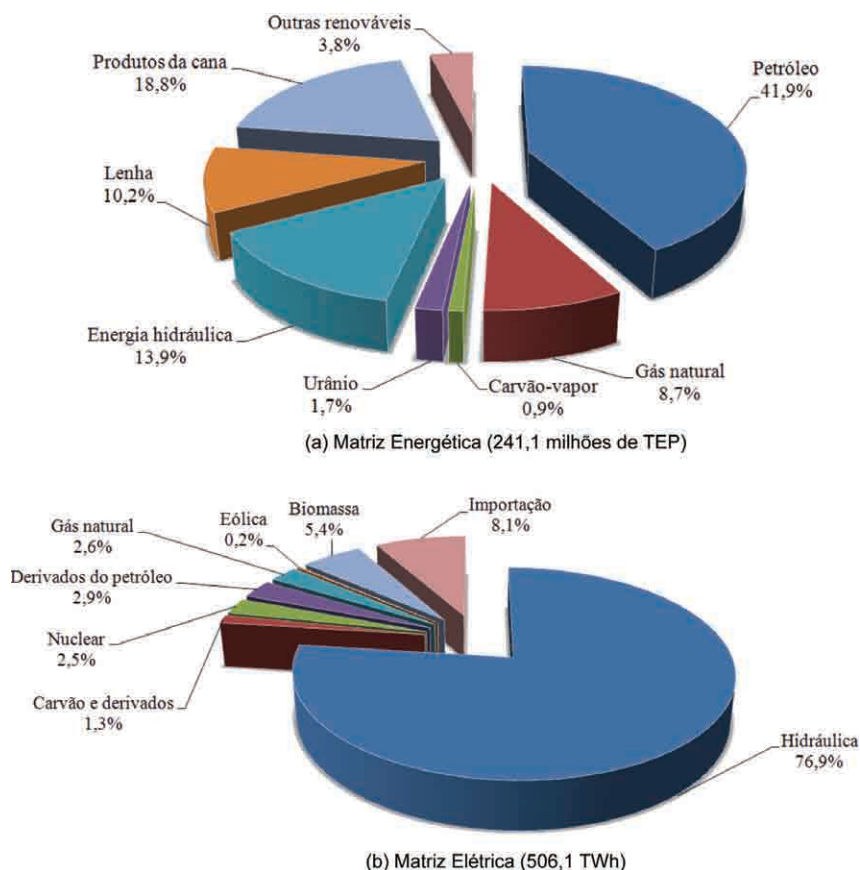


Gráfico 20.2 – Constituição das matrizes energética e elétrica brasileira

Fonte: EPE (2010)

Segundo dados da EPE (2010), ainda é muito baixa a participação da produção de eletricidade por meio da cogeração na matriz elétrica brasileira, correspondendo a algo em torno de 6% do total. Portanto, existe um grande espaço para crescimento, especialmente no que se diz respeito ao setor sucroalcooleiro.

De acordo com dados recentes da União das Indústrias da Cana-de-Açúcar (Unica), das 434 usinas de açúcar e de álcool em operação no país, apenas 100 (23%) exportam energia para o Sistema Integrado Nacional (SIN). Em São Paulo, estado mais importante no cenário sucroalcooleiro, esse percentual é um pouco maior, e de 182 usinas, 54 (30%) exportam sua energia ao sistema.

Assim, verifica-se que existe um grande potencial no setor sucroalcooleiro para a produção de energia elétrica excedente para comercialização, quer seja por meio do *retrofit* das usinas existentes, quer seja por meio da implantação de novos projetos, considerando, para tanto, o efeito do aumento dos níveis de pressão e temperatura do vapor, mediante a utilização de caldeiras e turbinas mais modernas e eficientes; da eletrificação dos acionamentos mecânicos e do uso de difusores para a extração do caldo, práticas essas que já vêm sendo difundidas no setor; bem como o aproveitamento da palha, quer seja para queima em caldeira, quer para gaseificação; além do aproveitamento da vinhaça, por meio da biodigestão e posterior gaseificação, práticas essas em fase de implantação e/ou ainda em desenvolvimento, sendo esses os fatores motivadores do presente estudo.

## **Caracterização dos sistemas de cogeração no setor sucroalcooleiro**

No setor sucroalcooleiro, o principal sistema de cogeração é aquele que emprega turbinas a vapor como máquinas térmicas e que aparece vinculado a três configurações fundamentais: turbinas de contrapressão, combinação de turbinas de contrapressão com outras de condensação que empregam o fluxo excedente, e turbinas de extração-condensação. A condensação de uma parte do vapor de escape, ou de uma extração de vapor de uma turbina de extração-condensação, garante as necessidades de energia térmica do sistema.

A Figura 20.2 apresenta graficamente um esquema de processo trabalhando em regime de cogeração que emprega turbinas de contrapressão.

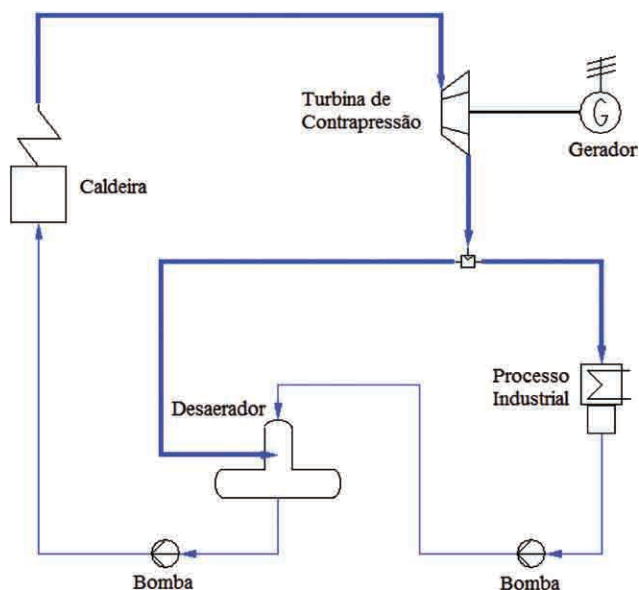


Figura 20.2 – Sistema de cogeração com turbinas a vapor de contrapressão

Quando o objetivo principal visa adequar a instalação para produção e venda de energia excedente, o uso de turbinas de extração-condensação é mais viável. Além de altos índices de desempenho, tais máquinas de condensação com extração regulada se justificam também pela sua capacidade de satisfazer a relação energia térmica e elétrica que pode variar em uma ampla faixa.

Esse sistema, com maior capacidade de produção elétrica, possui normalmente turbinas de extração dupla, sendo a primeira no nível de pressão em que o vapor é requerido pelas turbinas de acionamento mecânico, e a segunda na pressão em que o vapor é consumido no processo produtivo. Comumente, o vapor de escape das turbinas de acionamento mecânico soma-se ao fluxo da segunda extração, visando satisfazer a demanda de vapor do processo. Dentro do setor sucroalcooleiro, a adoção de tal sistema implica analisar a viabilidade de operação no período fora da safra, conjuntamente com o emprego de outros combustíveis para complementar a falta de bagaço na entressafra.



A Figura 20.3 ilustra um esquema de processo trabalhando em regime de cogeração que emprega uma turbina de extração-condensação.

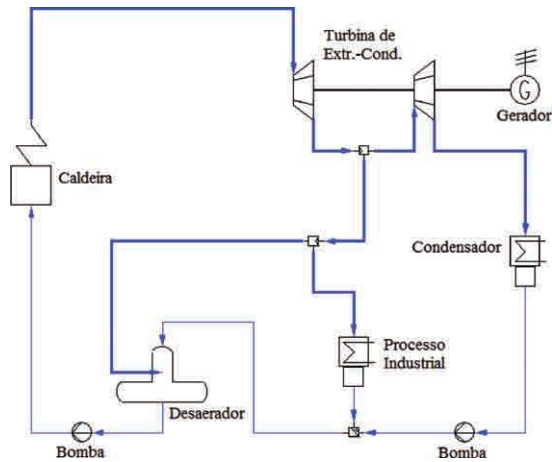


Figura 20.3 – Sistema de cogeração com turbina a vapor de extração-condensação

A tecnologia de geração de energia elétrica a partir da biomassa que integra a gaseificação do combustível e turbinas a gás em ciclo combinado é conhecida como BIG-GTCC (*Biomass Integrated Gasification – Gas Turbine Combined Cycle*). Nesse ciclo a biomassa é gaseificada e o gás combustível gerado é usado para o acionamento de uma turbina a gás acoplada a um gerador elétrico, produzindo eletricidade, conforme mostra a Figura 20.4.

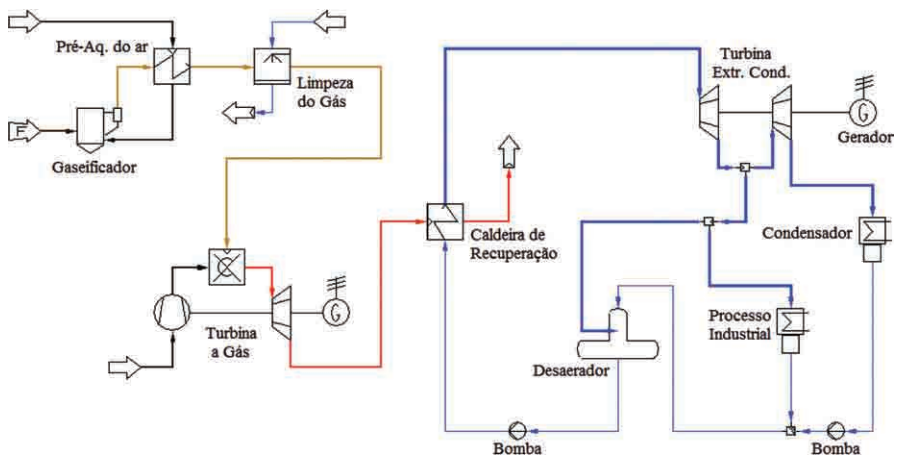


Figura 20.4 – Geração de energia elétrica a partir da biomassa que integra a gaseificação do combustível e turbinas a gás em ciclo combinado

Essa tecnologia estuda a viabilidade técnica e econômica de projetos de geração de energia elétrica utilizando-se a tecnologia de geração termelétrica em ciclo combinado, operando em cogeração, integrada a sistemas de gaseificação de biomassa para a produção de gás combustível.

Apesar das elevadas eficiências, projetadas para os ciclos combinados baseados em combustíveis gaseificados derivados da biomassa, os aspectos tecnológicos e a confiabilidade dos sistemas são ainda um ponto crítico do seu desenvolvimento.

Vale destacar que a estabilidade da combustão é um aspecto importante para a adaptação dos modelos comerciais de turbinas a gás para operação com gases de baixo poder calorífico, como o biogás. Uma vez que o gás de biomassa apresenta um menor aporte de calor, é necessária uma quantidade muito maior de combustível para uma mesma vazão de ar. Assim, todo o sistema deve ser adaptado para conter essa maior vazão de gás (Corrêa Neto, 2001).

## **Fundamentos e ferramentas para análise de sistemas de cogeração**

A seguir serão apresentados alguns fundamentos termodinâmicos, termoeconômicos e econômicos necessários para a análise de sistemas de cogeração de energia.

### **Fundamentos termodinâmicos**

#### **Leis da Termodinâmica, exergias e irreversibilidades**

Para esta análise considera-se um volume de controle em cada equipamento que compõe a planta e não se consideram os processos transitórios, como entrada em operação, parada ou qualquer variação no tempo.

A primeira análise a ser feita é com relação à conservação da massa, a qual considera as vazões de entrada e saída no volume de controle e a variação de massa no interior do mesmo. A Equação (20.1), também conhecida como equação da continuidade, representa o balanço de massa em um volume de controle.

$$\frac{dm_{v.c.}}{dt} = \sum \dot{m}_e - \sum \dot{m}_s \quad (20.1)$$

Considerando o processo em regime permanente, e que o estado da massa em cada ponto do volume de controle não varia com o tempo, a Equação (20.1) pode ser escrita como segue:

$$\sum \dot{m}_e - \sum \dot{m}_s = 0 \quad (20.2)$$

onde:

- $\dot{m}_e$ : vazão mássica que entra no volume de controle (kg/s);
- $\dot{m}_s$ : vazão mássica que sai do volume de controle (kg/s).

A equação da conservação da energia, conhecida como Primeira Lei da Termodinâmica, em sua forma completa, considerando inclusive as variações no tempo, é representada pela Equação (20.3) como segue:

$$\frac{dE_{v.c.}}{dt} = \dot{Q}_{v.c.} - \dot{W}_{v.c.} + \sum \dot{m}_e \left( h_e + \frac{V_e^2}{2} + gZ_e \right) - \sum \dot{m}_s \left( h_s + \frac{V_s^2}{2} + gZ_s \right) \quad (20.3)$$

onde:

- $g$ : aceleração gravitacional (m/s<sup>2</sup>);
- $h_e$ : entalpia específica na entrada do volume de controle (kJ/kg);
- $h_s$ : entalpia específica na saída do volume de controle (kJ/kg);
- $\dot{Q}_{v.c.}$ : potência térmica no volume de controle (kW);
- $V_e$ : velocidade da vazão mássica na entrada do volume de controle (m/s);
- $V_s$ : velocidade da vazão mássica na saída do volume de controle (m/s);
- $\dot{W}_{v.c.}$ : taxa de transferência de trabalho no volume de controle (kW);
- $Z_e$ : cota da vazão mássica na entrada do volume de controle em relação a uma linha de referência (m);
- $Z_s$ : cota da vazão mássica na saída do volume de controle em relação a uma linha de referência (m).

Serão adotadas, além da hipótese de regime permanente, as hipóteses de que as variações das energias cinética e potencial são muito pequenas, podendo ser desprezadas. Assim, a Equação (20.3) pode ser reescrita como segue:

$$\dot{Q}_{v.c.} - \dot{W}_{v.c.} + \sum \dot{m}_e h_e - \sum \dot{m}_s h_s = 0 \quad (20.4)$$

As irreversibilidades num processo são quantificadas pela Segunda Lei da Termodinâmica, por meio da propriedade chamada entropia. Para processos em um volume de controle, o balanço de entropia é definido como:

$$\frac{dS_{v.c.}}{dt} = \dot{S}_{ger, v.c.} + \sum \left( \frac{\dot{Q}_{v.c.,j}}{T_j} \right) + \sum \dot{m}_e s_e - \sum \dot{m}_s s_s \quad (20.5)$$

Para o processo em regime permanente, a Equação (20.5) pode ser reescrita como:

$$\dot{S}_{ger, v.c.} + \sum \left( \frac{\dot{Q}_{v.c.,j}}{T_j} \right) + \sum \dot{m}_e s_e - \sum \dot{m}_s s_s = 0 \quad (20.6)$$

onde:

- $s_e$ : entropia específica na entrada do volume de controle (kJ/kgK);
- $s_s$ : entropia específica na saída do volume de controle (kJ/kgK);
- $T_j$ : temperatura superficial do volume de controle (K);
- $\dot{S}_{ger, v.c.}$ : geração de entropia no volume de controle (kW/K).

A análise energética (Primeira Lei da Termodinâmica) não contabiliza a qualidade da energia que está se perdendo e nem onde ocorrem as irreversibilidades dos processos, ou seja, não identifica onde e por que elas aparecem. Assim, apesar de a análise energética continuar tendo sua validade, por meio de sua aplicação conjunta com a análise exérgica pode-se analisar melhor os sistemas térmicos, complementando as informações e permitindo o cálculo tanto do valor termodinâmico de um fluxo, em termos do trabalho mecânico que poderia ser extraído dele, como das ineficiências e perdas termodinâmicas reais dos processos nos sistemas.

Assim, é conveniente definir a exergia de fluxo de um estado em razão da capacidade (potencial) para realizar o máximo trabalho possível.

Para o cálculo da exergia específica dos fluidos é utilizada uma equação que leva em conta a exergia física e a exergia química:

$$\overline{ex}_{total} = (\overline{ex}_{fis}) + (\overline{ex}_{qui}) \quad (20.7)$$

A exergia física de um fluxo é calculada com base num estado de referência restrito ( $P_0$ ,  $T_0$ ) onde há equilíbrio térmico e mecânico com o meio, por meio da seguinte equação:

$$\overline{ex}_{fis} = (\overline{h} - \overline{h}_0) - T_0(\overline{s} - \overline{s}_0) + \frac{V^2}{2} + g(z - z_0) \quad (20.8)$$

Desprezando os termos da energia cinética e potencial, tem-se que a função exergia para um fluxo de matéria em regime permanente assume a seguinte forma:

$$\overline{ex}_{fis} = (\overline{h} - \overline{h}_0) - T_0(\overline{s} - \overline{s}_0) \quad (20.9)$$

Para haver equilíbrio completo com o meio, o sistema deve estar também em equilíbrio químico com ele. O trabalho que pode ser obtido mediante um processo reversível que leva o sistema do estado de referência restrito até o estado de referência onde há equilíbrio completo (“estado morto”), é a exergia química, definida por:

$$\overline{ex}_{qui} = \sum (\mu_i - \mu_{0,i}) x_i \quad (20.10)$$

onde:

- $\mu_{0,i}$ : potencial químico de referência do elemento ( $T_0, P_0$ );
- $\mu_i$ : potencial químico do elemento na mistura ( $T_0, P_0$ );
- $x_i$ : fração do componente na mistura.

Logo, a exergia total pode ser representada por:

$$\overline{ex}_{total} = (\overline{h} - \overline{h}_0) - T_0(\overline{s} - \overline{s}_0) + \sum (\mu_i - \mu_{0,i}) x_i \quad (20.11)$$

Para uma solução ideal de substâncias puras, a exergia química é dada por (Bejan et al., 1996):

$$\left(\overline{ex}\right)_{qui} = \sum \left(x_i \overline{ex}_i^0\right) + \overline{R} T_0 \sum \left(x_i \ln x_i\right) \quad (20.12)$$

sendo:

- $\overline{ex}_i^0$ : exergia química específica de cada componente no estado puro (kJ/kmol);
- $M_i$ : massa molecular de cada componente do combustível (kg/kmol);
- $\overline{R}$ : constante universal dos gases (8,3145 kJ/kmol K);
- $x_i$ : fração molar de cada componente do combustível (%).

O primeiro termo entre colchetes da Equação (20.12) representa a soma das parcelas das exergias químicas dos componentes do gás em estado puro. O segundo termo dessa equação representa a geração de entropia associada ao próprio fato de realizar a mistura e depende da concentração de cada substância presente na mesma.

A Tabela 20.1 mostra os valores da exergia química padrão para alguns componentes gasosos a  $T_0 = 25^\circ\text{C}$  e  $P_0 = 1 \text{ atm}$ , de acordo com Szargut et al. (1988).

Tabela 20.1 – Exergia química de alguns componentes gasosos no estado puro

Substância	Fórmula	$\bar{ex}^0$ (kJ/kmol)
Metano	$\text{CH}_4$	831.650
Etano	$\text{C}_2\text{H}_6$	1.495.840
Dióxido de Carbono	$\text{CO}_2$	19.870
Nitrogênio	$\text{N}_2$	720

Para o cálculo da exergia específica do bagaço e da palha da cana é utilizada a equação apresentada por Szargut et al. (1988), que leva em conta a correlação entre a exergia química e o poder calorífico inferior do combustível, considerando a relação entre as frações em massa de oxigênio e carbono, a composição elementar do combustível, e o conteúdo de umidade, conforme segue:

$$ex_{comb} = \beta(PCI_{comb} + L_{\acute{a}gua} Z_{\acute{a}gua}) + ex_{\acute{a}gua} Z_{\acute{a}gua} \quad (20.13)$$

sendo:

$$\beta = \frac{1,0412 + 0,2160 \left( \frac{Z_{\text{H}_2}}{Z_{\text{C}}} \right) - 0,2499 \left( \frac{Z_{\text{O}_2}}{Z_{\text{C}}} \right) \left[ 1 + 0,7884 \left( \frac{Z_{\text{H}_2}}{Z_{\text{C}}} \right) \right] - 0,0450 \left( \frac{Z_{\text{N}_2}}{Z_{\text{C}}} \right)}{1 - 0,3035 \left( \frac{Z_{\text{O}_2}}{Z_{\text{C}}} \right)} \quad (20.14)$$

onde:

- $\beta$  : função das frações de massa dos componentes da biomassa;
- $Z_{\text{H}_2}$  : fração em massa de hidrogênio na biomassa (%);
- $Z_{\text{O}_2}$  : fração em massa de oxigênio na biomassa (%);
- $Z_{\text{N}_2}$  : fração em massa de nitrogênio na biomassa (%);
- $Z_{\text{C}}$  : fração em massa de carbono na biomassa (%);
- $Z_{\acute{a}gua}$  : fração em massa de água na biomassa úmida (%);

- $PCI_{\text{bag}}$  : poder calorífico inferior da biomassa (kJ/kg);
- $L_{\text{água}}$  : entalpia de vaporização da água (kJ/kg);
- $ex_{\text{água}}$  : exergia química da água líquida (kJ/kg).

A Tabela 20.2 apresenta as características do bagaço de cana utilizadas para o cálculo da exergia (Camargo et al., 1990; Souza, 2001).

Tabela 20.2 – Características do bagaço e da palha da cana

Parâmetros	Bagaço	Palha	Unidades
Poder Calorífico Inferior	7.736	13.151	kJ/kg
Umidade	50,0	15,0	%
Carbono	46,3	45,03	%
Hidrogênio	6,4	6,3	%
Oxigênio	43,3	44,26	%
Nitrogênio	0,0	0,8	%

O balanço de exergia na sua forma completa é obtido quando a Equação (20.5) é multiplicada por  $T_0$  e, desse resultado, é subtraída a Equação (20.3), resultando:

$$\frac{dI_{v.c.}}{dt} = \sum \dot{Q}_j \left( 1 - \frac{T_0}{T_j} \right) - \dot{W}_{v.c.} + \sum \dot{m}_e ex_e - \sum \dot{m}_s ex_s - \dot{I}_{v.c.} \quad (20.15)$$

A taxa de variação instantânea de exergia ou de geração de irreversibilidade mostrada na Equação (20.15) é composta por vários termos. O primeiro termo após a igualdade, a taxa instantânea de exergia, está associado à transferência de calor; o segundo termo, à transferência de trabalho; o terceiro e o quarto, à transferência de massa; e o quinto e último termos, associados à destruição de exergia ou geração de irreversibilidade.

Para um processo em regime permanente, a Equação (20.15) pode ser reescrita como segue:

$$\dot{I}_{v.c.} = \sum \dot{Q}_j \left( 1 - \frac{T_0}{T_j} \right) - \dot{W}_{v.c.} + \sum \dot{m}_e ex_e - \sum \dot{m}_s ex_s \quad (20.16)$$

onde:

- $ex_e$  : exergia específica na entrada do volume de controle (kJ/kg);
- $ex_s$  : exergia específica na saída do volume de controle (kJ/kg);

- $T_j$ : temperatura superficial do volume de controle (K);
- $T_0$ : temperatura do estado morto (K);
- $i_{v.c.}$ : variação temporal da exergia no volume de controle ( $= T_0 \dot{S}_{ger, v.c.}$ ) (kW).

Vale destacar que foi adotado neste estudo para o estado morto  $T_0 = 298,15 \text{ K}$  e  $P_0 = 101,3 \text{ kPa}$ .

### Eficiências térmicas para equipamentos e para o sistema de cogeração

A seguir serão formuladas as eficiências térmicas dos principais equipamentos utilizados em sistemas de cogeração e, também, desses sistemas como um todo.

#### Turbinas, bombas e compressores

Para turbinas, a eficiência pela primeira lei ( $\eta_I$ ) pode ser definida como sendo a razão entre o trabalho produzido no volume de controle e o trabalho que seria produzido no processo isentrópico. A Equação (20.17) apresenta a eficiência com base na primeira lei para turbinas:

$$\eta_I = \frac{\dot{W}_{vc}}{\dot{m} \Delta h_{iso}} \quad (20.17)$$

onde:

- $\Delta h_{iso}$ : diferença entre as entalpias de entrada e de saída do volume de controle, para processo isentrópico (kJ/kg);
- $\dot{m}$ : vazão mássica no volume de controle (kg/s);
- $\dot{W}_{vc}$ : potência desenvolvida no volume de controle (kW).

A definição de eficiência pela segunda lei ( $\eta_{II}$ ) para turbinas envolve a comparação entre o trabalho real produzido no processo e a variação de exergia entre os estados de entrada e saída, de acordo com a equação a seguir:

$$\eta_{II} = \frac{\dot{W}_{v.c.}}{\dot{m}(ex_e - ex_s)} \quad (20.18)$$

onde:

- $ex_e$ : exergia específica do vapor na entrada da turbina (kJ/kg);
- $ex_s$ : exergia específica do vapor na saída da turbina (kJ/kg).



Para o caso de bombas e compressores, as eficiências pela primeira e segunda leis são definidas de maneira inversa:

$$\eta_I = \frac{\dot{m} \Delta h_{iso}}{\dot{W}_{vc}} \quad (20.19)$$

$$\eta_{II} = \frac{\dot{m}(ex_e - ex_s)}{\dot{W}_{v.c.}} \quad (20.20)$$

### Caldeira convencional

Para caldeiras convencionais a bagaço, a eficiência pela primeira lei, considerando que a vazão de água de alimentação e de vapor de saída seja a mesma, é dada pela equação:

$$\eta_I = \frac{\dot{m}_{vapor}(h_{vapor} - h_{água})}{\dot{m}_{bag} PCI_{bag}} \quad (20.21)$$

onde:

- $h_{vapor}$ : entalpia específica do vapor na saída da caldeira (kJ/kg);
- $h_{água}$ : entalpia específica da água na entrada da caldeira (kJ/kg);
- $\dot{m}_{vapor}$ : vazão mássica de vapor na saída da caldeira (kg/s);
- $\dot{m}_{bag}$ : vazão mássica de bagaço consumido na caldeira (kg/s);
- $PCI_{bag}$ : poder calorífico inferior do bagaço com umidade 50% (7.736 kJ/kg).

A eficiência pela segunda lei para caldeiras pode ser definida como segue:

$$\eta_{II} = \frac{\dot{m}_{vapor}(ex_{vapor} - ex_{água})}{\dot{m}_{bag} ex_{bag}} \quad (20.22)$$

onde:

- $ex_{vapor}$ : exergia específica do vapor na saída da caldeira (kJ/kg);
- $ex_{água}$ : exergia específica da água na entrada da caldeira (kJ/kg);
- $ex_{bag}$ : exergia específica do bagaço da cana (kJ/kg).

### Caldeira de recuperação

Para caldeiras de recuperação de calor, considerando que a vazão de água de alimentação é igual à vazão de vapor gerado, a eficiência pela primeira lei ( $\eta_I$ ) é dada por:

$$\eta_I = \frac{\dot{m}_{vapor} (h_{s,vapor} - h_{e,\acute{a}gua})}{\dot{m}_{gases} (h_{e,gases} - h_{s,gases})} \quad (20.23)$$

onde:

- $\dot{m}_{vapor}$ : vazão mássica de vapor na saída da caldeira (kg/s);
- $\dot{m}_{gases}$ : vazão mássica de gases de exaustão (kg/s);
- $h_{s,vapor}$ : entalpia específica do vapor na saída da caldeira (kJ/kg);
- $h_{e,\acute{a}gua}$ : entalpia específica da água líquida na entrada da caldeira (kJ/kg);
- $h_{e,gases}$ : entalpia específica dos gases na entrada da caldeira (kJ/kg);
- $h_{s,gases}$ : entalpia específica dos gases na saída da caldeira (kJ/kg).

A eficiência pela segunda lei ( $\eta_{II}$ ) para a caldeira de recuperação é calculada pela relação entre o fluxo de exergia do vapor produzido menos o fluxo de exergia da água que entra na caldeira e a diferença entre os fluxos de exergia dos gases de exaustão que entram e saem na caldeira, de acordo com a equação:

$$\eta_{II} = \frac{\dot{m}_{vapor} (ex_{s,vapor} - ex_{e,\acute{a}gua})}{\dot{m}_{gases} (ex_{e,gases} - ex_{s,gases})} \quad (20.24)$$

onde:

- $ex_{s,vapor}$ : exergia específica do vapor na saída da caldeira (kJ/kg);
- $ex_{e,\acute{a}gua}$ : exergia específica da água líquida na entrada da caldeira (kJ/kg);
- $ex_{e,gases}$ : exergia específica dos gases na entrada da caldeira (kJ/kg);
- $ex_{s,gases}$ : exergia específica dos gases na saída da caldeira (kJ/kg).

### Turbina a gás

A eficiência da turbina a gás representa a eficiência total do conjunto (compressor, câmara de combustão e expansor) e leva em conta a potência líquida de eixo em relação à potência fornecida pelo combustível, conforme mostra a equação a seguir:

$$\eta_I = \frac{W_{TG}}{\dot{m}_{comb} PCI_{comb}} \quad (20.25)$$

Diversos fatores influem diretamente no desempenho da turbina, como a razão de pressão, temperatura de entrada no expansor e eficiências isentrópicas da turbina e do compressor.

A eficiência pela segunda lei para a turbina a gás é calculada pela relação entre a potência líquida de eixo da turbina e a variação de exergia entre o combustível, o ar e os gases de exaustão, de acordo com a equação:

$$\eta_{II} = \frac{\dot{W}_{TG}}{\dot{m}_{comb}ex_{comb} + \dot{m}_{ar}ex_{ar} - \dot{m}_{gases}ex_{gases}} \quad (20.26)$$

### Gaseificador

A eficiência do gaseificador é calculada em razão dos parâmetros do gás obtido e dos insumos utilizados, ou seja, o combustível sólido e o ar utilizado para a gaseificação. Ao contrário das plantas que operam com gaseificadores pressurizados, os sistemas que utilizam gaseificadores atmosféricos precisam promover o resfriamento do gás antes de sua compressão para utilização na turbina a gás. A eficiência a frio de um gaseificador é definida pela equação a seguir (Nogueira; Lora, 2003):

$$\eta_f = \frac{\dot{m}_{gas} PCI_{gas}}{\dot{m}_{comb} PCI_{comb} + \dot{m}_{ar} h_{ar}} \quad (20.27)$$

A eficiência a frio do gaseificador considera apenas a energia que pode ser liberada por meio da combustão. Em aplicações térmicas da gaseificação, quando o gás resultante é utilizado para geração de vapor ou é queimado diretamente em fornos, é mais conveniente definir a eficiência a quente do gaseificador, de acordo com a equação a seguir (Nogueira; Lora, 2003):

$$\eta_q = \frac{\dot{m}_{gas} PCI_{gas} + \dot{m}_{gas} h_{gas}}{\dot{m}_{comb} PCI_{comb} + \dot{m}_{ar} h_{ar}} \quad (20.28)$$

### Índices de desempenho para sistemas de cogeração

O objetivo da utilização de índices de desempenho é avaliar os sistemas de cogeração como um todo, esclarecendo as diferenças entre eles, fundamentalmente com relação à aplicação de métodos baseados na primeira e na segunda leis da termodinâmica. A seguir serão apresentados alguns desses índices.

#### Eficiência global da planta

A avaliação pela primeira lei da termodinâmica permite calcular as potências de eixo produzidas para os acionamentos dos geradores elétricos

( $\dot{W}_{ger,ele}$ ), além das potências consumidas na planta, relativas ao bombeamento ( $\dot{W}_{bomb}$ ) e à compressão ( $\dot{W}_{comp}$ ). Também, por meio da primeira lei, pode-se determinar a potência térmica útil no processo para o sistema de evaporação da água do caldo ( $\dot{Q}_{util}$ ) e a perda no condensador ( $\dot{Q}_{cond}$ ).

Para uma avaliação geral da planta, devem-se considerar a potência elétrica disponível para exportação, a potência térmica e a energia da fonte quente da planta. A potência disponível para exportação é dada pela potência total gerada descontando-se a potência consumida no bombeamento e compressão e a consumida pela usina ( $\dot{W}_{consumo}$ ). Assim, pode-se definir a eficiência global do sistema ( $\eta_{global}$ ), conforme ilustrado pela equação que segue:

$$\eta_{global} = \frac{\dot{W}_{ger,ele} + \dot{Q}_{util} - \dot{W}_{comp} - \dot{W}_{bomb} - \dot{W}_{consumo}}{\dot{m}_{comb} PCI_{comb}} \quad (20.29)$$

Esse índice representa o aproveitamento líquido da energia do combustível, pois considera a energia útil, na forma de potência eletromecânica ou energia térmica, e a energia consumida no ciclo termodinâmico.

### Eficiência de aproveitamento da biomassa

A definição da eficiência global, de acordo com a Equação (20.29), tem como base apenas a energia fornecida à planta, desconsiderando a energia de outras fontes disponíveis na indústria que poderiam ser utilizadas para fins energéticos, mas que não são aproveitadas. Assim, será considerada também uma eficiência de aproveitamento energético da biomassa como sendo a relação entre a energia útil, seja ela térmica, seja eletromecânica, e a energia total da biomassa disponível para aproveitamento, ou seja, bagaço, palha e biogás da vinhaça, independentemente se ela estiver ou não sendo aproveitada na planta, sendo definida por:

$$\eta_{aprov,biom} = \frac{\dot{W}_{ger,ele} + \dot{Q}_{util} - \dot{W}_{comp} - \dot{W}_{bomb} - \dot{W}_{consumo}}{\dot{m}_{bagaço} PCI_{bagaço} + \dot{m}_{palha} PCI_{palha} + \dot{m}_{biogás} PCI_{biogás}} \quad (20.30)$$

### Razão potência-calor

Outro índice importante é a relação entre a potência disponível para exportação ( $\dot{W}_{export}$ ) e a energia térmica utilizada no processo. Assim, define-se a razão potência-calor (RPC) como:

$$RPC = \frac{\dot{W}_{exp\,ort}}{\dot{Q}_{útil}} \quad (20.31)$$

A partir do cálculo desses parâmetros é possível identificar as vantagens e/ou desvantagens de um sistema de cogeração em relação a outro.

### Relação bagaço-vapor

O consumo específico de bagaço, ou relação bagaço-vapor ( $R_{bag,vap}$ ), é um parâmetro importante que está associado à eficiência das caldeiras. Tal parâmetro é calculado a partir da quantidade de bagaço que é necessária para se produzir um quilograma de vapor na pressão e temperatura desejada. Assim, tem-se:

$$R_{bag,vap} = \frac{\dot{m}_{bag}}{\dot{m}_{vapor}} \quad (20.32)$$

Conhecido o valor de projeto do consumo específico de bagaço por unidade de vapor gerado numa caldeira, pode-se determinar seu consumo de bagaço para uma determinada produção de vapor, conforme mostrado na Equação (20.32).

### Relação vapor-cana moída

No que diz respeito à demanda térmica de processo de fabricação de açúcar e álcool, a relação vapor-cana moída ( $R_{vapor,cana}$ ) representa a energia térmica que está sendo usada no processo e é dada em quilogramas de vapor por tonelada de cana moída. O objetivo das plantas é reduzir esse número, ou seja, conseguir processar o caldo da cana com a menor demanda de vapor possível. A Equação (20.33) ilustra o cálculo dessa relação para uma dada quantidade de cana moída ( $\dot{m}_{cana}$ ):

$$R_{vapor,cana} = \frac{\dot{m}_{vapor}}{\dot{m}_{cana}} 1000 \quad (20.33)$$

### Relação potência elétrica-cana moída

Analogamente à relação  $R_{vapor,cana}$ , pode-se caracterizar a relação da energia elétrica disponível para exportação, em kWh, para cada tonelada de

cana moída ( $R_{pot,cana}$ ). A equação a seguir ilustra essa relação para o fluxo de cana dado em t/h:

$$R_{pot,cana} = \frac{\dot{W}_{export}}{\dot{m}_{cana}} \quad (20.34)$$

Esse número difere em usinas que têm turbinas nos acionamentos mecânicos para aquelas que utilizam motores elétricos nos mesmos acionamentos. Neste último caso, essa relação é maior, já que a potência elétrica instalada e a demanda são maiores. Portanto, quando  $R_{pot,cana}$  for utilizada para comparar diferentes plantas, deve-se considerar que tipo de acionamento é utilizado.

### Relação vapor consumido-potência elétrica

A razão entre o vapor consumido (kg/s) e a potência elétrica gerada ( $R_{vapotele}$ ) expressa por kg/kWh pode ser dada por:

$$R_{vap,ele} = \frac{3.600 \cdot \dot{m}_{vap}}{\dot{W}_{ger,ele}} \quad (20.35)$$

Essa relação é conhecida como consumo específico de vapor, quer seja numa turbina ou numa planta como um todo.

### Relação bagaço-potência total

Essa relação representa a razão entre a quantidade total de bagaço consumido (kg/s) pelas turbinas da planta com relação à potência total produzida, quer seja nas turbinas de geração de eletricidade ( $\dot{W}_{ele}$ ) ou de acionamento mecânico ( $\dot{W}_{mec}$ ), dada em kg/kWh:

$$R_{bag,pot} = \frac{3.600 \cdot \dot{m}_{bag}}{(\dot{W}_{ele} + \dot{W}_{mec})} \quad (20.36)$$

## Fundamentos termoeconômicos

### Definição de termoeconomia

*Termoeconomia* é um termo que combina a análise termodinâmica com os princípios de economia. Como as considerações termodinâmicas utilizadas

na Termoeconomia são baseadas no conceito de exergia, o termo *Exergoeconomia* também é muitas vezes utilizado para a descrição dessa combinação.

A análise termoeconômica objetiva a determinação de custos de produção em base exergética e emprega critérios de partição/distribuição de custos em plantas multiprodutos, tal como em sistemas de cogeração, também em base exergética.

De acordo com Tsatsaronis (1993), uma completa análise termoeconômica consiste em:

- Identificar a localização, magnitude e fontes de perdas termodinâmicas reais num sistema;
- Calcular os custos associados às destruições, perdas e exergia;
- Calcular separadamente o custo de cada produto gerado pelo sistema que possui mais de um produto final.

Assim, mediante uma análise termoeconômica, é possível (Bejan et al., 1996):

- Entender o processo de formação de custo e o fluxo de custos no sistema;
- Facilitar estudos de viabilidade e otimização na fase de projeto ou melhorar o processo de um sistema existente;
- Aperfeiçoar variáveis específicas em um único componente;
- Aperfeiçoar o sistema global;
- Auxiliar em procedimentos de tomada de decisão relacionados à operação e manutenção;
- Comparar alternativas técnicas.

### **Vertentes e metodologias da termoeconomia**

Ao longo das décadas de 1980 e 1990, muitos pesquisadores se dedicaram ao estudo da termoeconomia. Diferentes metodologias e abordagens foram propostas para a sua implementação matemática, descrevendo de maneira adequada a distribuição dos custos exergéticos e monetários entre os equipamentos que compõem um sistema térmico. Assim, surgiram duas vertentes principais na termoeconomia, as quais serão descritas resumidamente na sequência.

A primeira vertente da termoeconomia estabelece que a otimização é parte integrante e fundamental da divisão dos custos, justificando o uso da exergia pela possibilidade de se dividir instalações complexas em partes que possam ser otimizadas separadamente.

A segunda vertente da termoeconomia utiliza a alocação dos custos médios dos produtos (externos e internos) e dos componentes do sistema, satisfazendo alguns objetivos, como determinar o custo atual dos produtos ou serviços, propiciar bases racionais para a fixação dos preços dos produtos e serviços, fornecer um meio de alocar e controlar os gastos e fornecer informações a partir das quais decisões operacionais podem ser estabelecidas e avaliadas.

Na primeira vertente podem ser destacadas as metodologias de “Otimização Termoeconômica”, desenvolvida por El-Sayed e Evans (1970), e de “Análise Funcional Termoeconômica”, proposta por Frangopoulos (1983); e na segunda vertente a metodologia da “Teoria do Custo Exergético”, difundida por Lozano e Valero (1993), que será a metodologia utilizada no presente estudo, merecendo, portanto, uma melhor descrição a seguir.

### Teoria do custo exergético

Essa análise é baseada na contabilidade da destruição de exergia que experimentam os fluxos na sua passagem por meio dos diferentes equipamentos constituintes do sistema. Dessa forma, são contabilizadas as eficiências (e perdas exergéticas), em cada um dos volumes de controle do sistema, tendo como resultado o custo exergético de cada um dos portadores de energia.

Um balanço de custo aplicado para o  $k$ -ésimo componente do sistema mostra que a soma das taxas de custos associadas com todos os fluxos de exergia de saída é igual à soma das taxas de custos de todos os fluxos de exergia de entrada mais o custo apropriado em razão do investimento de capital e despesas de operação e manutenção. Conseqüentemente, para um componente  $k$  que recebe uma transferência de calor e gera potência, resulta a seguinte equação (Lozano; Valero, 1993):

$$\sum_s \dot{C}_{s_k} + \dot{C}_{W_k} = \dot{C}_{Q_k} + \sum_e \dot{C}_{e_k} + \dot{Z}_k \quad (20.37)$$



onde:

- $\dot{C}_{s_k}$ : custo médio do fluxo de saída por unidade de tempo no componente k (R\$/s);
- $\dot{C}_{w_k}$ : custo médio do trabalho por unidade de tempo no componente k (R\$/s);
- $\dot{C}_{Q_k}$ : custo médio do calor por unidade de tempo no componente k (R\$/s);
- $\dot{C}_{e_k}$ : custo médio do fluxo de entrada por unidade de tempo no componente k (R\$/s);
- $\dot{Z}_k$ : custo médio total do equipamento por unidade de tempo no componente k (R\$/s).

Por meio da Equação (20.37) é possível constatar que o custo total dos fluxos de saída de exergia é igual à despesa total para obtê-lo. É interessante notar que, quando um componente recebe potência (compressor ou bomba), o termo  $\dot{C}_{w_k}$  muda o seu sinal. O mesmo ocorre quando existe transferência de calor do componente, onde o termo  $\dot{C}_{Q_k}$  aparece com sinal negativo. Geralmente os balanços de custos são escritos de forma que todos os termos são positivos, assim, o que se faz é rearranjar a equação transferindo os termos para esquerda ou para a direita de acordo com o sinal.

Para vazões mássicas entrando e saindo com taxas associadas de transferência de exergia ( $\dot{E}x_e$  e  $\dot{E}x_s$ ), potência ( $\dot{W}$ ), e a taxa de transferência de exergia associada com a transferência de calor ( $\dot{E}x_q$ ), tem-se:

$$\dot{C}_e = c_e \dot{E}x_e = c_e \dot{m}_e ex_e \quad (20.38)$$

$$\dot{C}_s = c_s \dot{E}x_s = c_s \dot{m}_s ex_s \quad (20.39)$$

$$\dot{C}_W = c_W \dot{W} \quad (20.40)$$

$$\dot{C}_Q = c_Q \dot{E}x_Q \quad (20.41)$$

onde:  $c_e$ ,  $c_s$ ,  $c_W$  e  $c_Q$  denotam os custos médios por unidade de exergia em reais por Gigajoule (R\$/GJ).

No  $k$ -ésimo componente, as taxas de exergia entrando e saindo ( $\dot{E}x_e$  e  $\dot{E}x_s$ ), bem como as de calor transferido e de trabalho ( $\dot{E}x_q$  e  $\dot{W}$ ) são calculadas em uma análise exergetica.

Antes da determinação de  $\dot{Z}_k$ , deve ser calculado o custo anual dos equipamentos com amortização ( $Z_k^a$ ), levando-se em conta as despesas com investimento de capital e com operação e manutenção, por meio da equação:

$$Z_k^a = Z_k (f_a + f_{omf} + FC f_{omv}) \quad (20.42)$$

sendo:

- $Z_k$ : custo de investimento de capital no equipamento  $k$  (R\$);
- $f_a$ : fator de amortização;
- $f_{omf}$ : percentual de custo anual fixo associada à operação e manutenção;
- $f_{omv}$ : percentual de custo anual variável de operação e manutenção;
- $FC$ : fator de carga.

O fator de amortização ( $f_a$ ) pode ser calculado pela seguinte expressão:

$$f_a = \frac{i(1+i)^n}{(1+i)^n - 1} \quad (20.43)$$

sendo:

- $i$ : taxa anual de juros (%);
- $n$ : período de amortização (anos).

Assim, tem-se:

$$Z_k^a = Z_k \left( \frac{i(1+i)^n}{(1+i)^n - 1} + f_{omf} + FC f_{omv} \right) \quad (20.44)$$

A taxa de custo para cada equipamento ( $\dot{Z}_k$ ), levando-se em conta as despesas com investimento de capital, operação e manutenção, além do tempo efetivo de funcionamento, pode ser calculada por (Leite, 2003):

$$\dot{Z}_k = \frac{Z_k^a}{3600 t_{oper}} \quad (20.45)$$

sendo:

- $\dot{Z}_k$ : taxa de custo do equipamento  $k$  (R\$/s);
- $Z_k^a$ : custo anual de equipamento  $k$  com amortização (R\$/ano);
- $t_{oper}$ : tempo efetivo de operação do equipamento  $k$  (h).

Introduzindo as expressões de taxa de custo, Equações (20.38) a (20.41), e a Equação (20.45) na Equação (20.37), obtém-se:

$$\sum_s (c_s \dot{E}x_s)_k + c_{w_k} \dot{W}_k = c_{Q_k} \dot{E}x_{Q_k} + \sum_e (c_e \dot{E}x_e)_k + \frac{Z_k^a}{3600 t_{oper}} \quad (20.46)$$

Na Equação (20.46) as variáveis correspondem aos custos particionados por unidade de exergia para os fluxos de exergia associados com o componente  $k$  ( $c_{e_k}$ ,  $c_{s_k}$ ,  $c_{w_k}$  e  $c_{Q_k}$ ). Para analisar cada componente pode-se assumir que os custos por unidade de exergia são conhecidos para todos os fluxos de entrada. Caso uma corrente venha a incorporar o sistema, o custo dessa corrente será o seu custo de compra; logo, as variáveis desconhecidas a serem calculadas pelo balanço de custos para o  $k$ -ésimo componente são os custos por unidade de exergia dos fluxos que saem ( $c_{s_k}$ ). No caso do componente analisado transferir calor ou potência, o custo por unidade de exergia deverá ser associado como transferência de potência ( $\dot{W}$ ) ou calor ( $c_{Q_k}$ ).

A determinação dos custos é feita de acordo com um conjunto de regras (postulados) enumerada por Lozano e Valero (1993) que considera um conjunto de definições prévias de estrutura física e produtiva de modo a gerar um sistema de equações para a determinação dos custos dos fluxos de uma instalação, a saber:

- *Postulado 1:* Custos exergéticos são quantidades conservativas como consequência de suas definições, e pode-se, portanto, escrever uma equação de balanço para cada unidade do sistema.
- *Postulado 2:* Na ausência de informações externas, o custo por unidade de exergia é o custo de aquisição do insumo.
- *Postulado 3:* Todos os custos gerados no processo produtivo devem ser incluídos no custo final dos produtos, o que se traduz na atribuição de custo zero a todas as perdas.

Os Postulados 2 e 3 permitem escrever tantas equações quanto forem os fluxos supridos ao sistema de perdas. Como em geral o número de fluxos é superior à soma do número de sistemas, dos fluxos de entrada e das perdas, as equações obtidas pela aplicação dos Postulados 1 a 3 não constituem um sistema determinado. As equações adicionais serão obtidas pela aplicação dos dois postulados finais, que são:

- *Postulado 4a*: Se um fluxo que sai de uma unidade for parte do insumo desta unidade, então o custo exergético do fluxo é constante através da unidade.
- *Postulado 4b*: Se o produto de uma unidade é composto por mais de um fluxo, então são iguais os custos exergéticos de cada um desses fluxos.

A resolução do sistema de equações envolve o uso de equações complementares, de modo a distribuir custos entre os produtos. Os dois últimos postulados mencionados fornecem uma base para arbitrar essa distribuição. Outra forma de explicitar essa distribuição foi proposta por Reistad e Gaggioli (1980), tomando-se o exemplo de uma turbina de contrapressão e propondo-se quatro métodos:

- *Método das extrações*: considera que a geração de potência é a única finalidade da utilização da turbina. Todos os custos de capital e a irreversibilidade gerada são alocados ao produto, ou seja, à potência elétrica/mecânica produzida, de modo que os fluxos de vapor que entram e saem da turbina possuem o mesmo custo exergético unitário.
- *Métodos das igualdades*: considera-se que, além da potência, o vapor de baixa pressão que deixa a turbina também constitui um produto. Neste caso a turbina funcionaria tal qual uma válvula de expansão. Assim, os custos de capital e da irreversibilidade da turbina são distribuídos entre os produtos, ou seja, os custos unitários da potência e do vapor de baixa pressão possuem o mesmo valor.
- *Método do trabalho como subproduto*: nesse caso, a produção de vapor de baixa pressão é considerada o produto principal do sistema e a potência gerada é vista como um aproveitamento.
- *Método do vapor como subproduto*: a potência é considerada como produto principal e o vapor como subproduto.

Verifica-se que existe uma associação entre os Postulados de Lozano e Valero (1993) e os Métodos de Reistad e Gaggioli (1980), pois os postulados 4a e 4b são, essencialmente, os critérios das extrações (que pode ser aplicada a outros equipamentos além da turbina) e das igualdades. Também é importante notar que os métodos de subprodutos não guardam relação com os processos reais da planta, pois consideram a determinação de uma das incógnitas em uma condição ótima de produção.

## Fundamentos econômicos

As técnicas mais sofisticadas de análise de investimento de capital, segundo Gitman (1984), consideram o fator tempo no valor do dinheiro e envolvem conceitos de fluxos de caixa supostamente conhecidos ao longo da vida útil do projeto.

Os critérios de rentabilidade baseados em fluxos de caixa descontados têm duas importantes características: por um lado, supõem a consideração de todos os fluxos de caixa associados ao investimento ao longo de toda sua vida útil e, por outro lado, fazem uso do princípio do desconto. A avaliação de um projeto de investimento faz uso da taxa de desconto ( $j$ ), ou taxa mínima de atratividade (TMA), a qual representa o custo de oportunidade do capital investido ou uma taxa definida pela empresa em função de sua política de investimento (Galesne et al., 1999).

Horlock (1997) apresenta uma série de técnicas desenvolvidas para avaliar projetos de cogeração, baseadas no Valor Presente Líquido (VPL), preço da eletricidade, fluxos de caixa atualizados, preço do calor e períodos de *payback*.

A utilização do método do *payback*, ou tempo de recuperação do capital, corresponde a uma ideia muito simples: aquela segundo a qual um investimento é tanto mais interessante quanto suas entradas de caixa anuais permitirem mais rapidamente recuperar o capital inicialmente investido (Galesne et al., 1999). O uso desse método está associado a um dos critérios de rentabilidade baseados no fluxo de caixa descontado, descritos a seguir.

### Valor presente líquido

Técnicas baseadas nos fluxos de caixa são as mais utilizadas para descrever a interação entre as despesas com capital e os benefícios obtidos anualmente com a implantação de um projeto. Esses benefícios são obtidos pelo uso do combustível de uma forma mais racional. O método consiste em atualizar até o ano zero de operação os benefícios obtidos durante a vida útil do projeto a uma taxa de desconto e, depois, esses valores são somados e descontados do capital gasto inicialmente, o valor resultante é denominado como o Valor Presente Líquido (VPL). O método VPL demonstra explicitamente o lucro real líquido que o investidor deve receber ao longo da vida útil do projeto, sendo definido por:

$$VPL = \sum_k^N \frac{ELC}{(1+j)^k} - CTI \quad (20.47)$$

onde:

- *ELC*: entrada líquida de capital anual (R\$);
- *j*: taxa de desconto adotada (%);
- *N*: período de análise (anos);
- *CTI*: capital total investido no início de operação do projeto (R\$).

O critério quando o VPL é usado para tomar decisões do tipo “aceitar” ou “recusar” o projeto é o seguinte: se o VPL for maior ou igual à zero deve-se aceitar o projeto, pois a empresa obterá um retorno igual ou maior que o custo de capital investido e o projeto conservará ou aumentará o seu patrimônio; caso contrário, se o VPL for menor que zero, deve-se recusar o projeto.

Horlock (1997) apresenta uma variação do cálculo do VPL que possibilita visualizar graficamente o período em que o fluxo de caixa atualizado e acumulativo anula o investimento inicial (CTI). Nesse ponto de intersecção, os benefícios obtidos com o projeto implantado retomam o investimento inicial a uma taxa de desconto (*j*). Esse método é denominado *Discount Cash Flow* e a intersecção no ponto zero possibilita determinar o Tempo de Retorno do Investimento (*TRI*).

O Gráfico 20.3 mostra o TRI e o VPL graficamente.

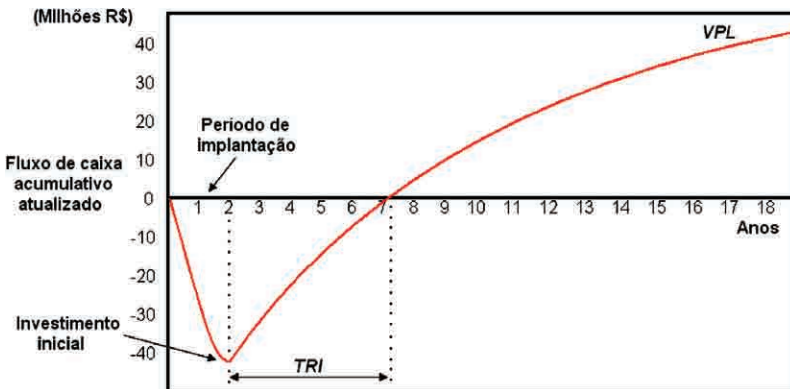


Gráfico 20.3 – Fluxo de caixa acumulativo típico de um projeto

### Taxa interna de retorno

Segundo Gitman (1984), provavelmente a técnica de análise mais utilizada para se avaliar alternativas de investimento é a Taxa Interna de Retorno (TIR). A taxa interna de retorno de um investimento é a taxa  $j^*$  que retorna o valor presente das entradas líquidas de caixa associadas ao projeto igual ao investimento inicial ou, equivalentemente, a taxa  $j^*$  que torna o VPL do projeto igual a zero. Trata-se de um critério mais objetivo, no qual a decisão para avaliar o projeto baseia-se no custo de capital. Se a TIR for maior ou igual ao custo do capital ou taxa de desconto adotada, deve-se aceitar o projeto, caso contrário, deve-se rejeitar o projeto.

A TIR é determinada iterativamente, segundo a expressão:

$$\sum_k^N \frac{ELC}{(1+j^*)^k} - CTI = 0 \quad (20.48)$$

onde:

$-j^*$ : taxa de interna de retorno de um investimento (%).

### Comparação entre as técnicas VPL e TIR

As diferenças básicas entre as técnicas de análise adotadas, VPL e TIR, resultam em classificações conflitantes. Com base puramente teórica, o uso do VPL é melhor. Sua superioridade teórica é atribuída a inúmeros fatores. O mais importante é a suposição implícita no uso do VPL de que todas as entradas de caixa intermediárias geradas pelo investimento são reinvestidas ao custo de capital da empresa, enquanto no uso da TIR supõe-se o reinvestimento da taxa especificada pela TIR, frequentemente irrealista.

Um segundo problema teórico é o de se encontrar comumente mais de uma TIR para padrões não convencionais de fluxos de caixa. O problema de múltiplas TIR resulta de propriedades matemáticas específicas dos cálculos envolvidos. Em razão da natureza técnica desse problema, é suficiente dizer que um fluxo de caixa pode ter mais de uma TIR e que, nesse caso, torna-se difícil sua interpretação.

Uma terceira crítica resulta do fato de que determinados fluxos podem ter propriedades matemáticas tais que nem exista uma TIR. De novo, esse problema técnico pode provocar dificuldades que não ocorrerão com a abordagem do VPL.

Já que a abordagem do VPL não tem as deficiências descritas antes, do ponto de vista teórico ela é preferível. Apesar desse fato, os administradores financeiros das grandes empresas preferem usar a TIR, o que é atribuível a sua preferência por taxas de retorno ao invés de retorno em dinheiro.

Por se mencionarem frequentemente juros e medidas de lucratividade, como taxas, o uso da TIR faz mais sentido para os responsáveis pelas decisões nas empresas. Eles tendem a achar o VPL mais difícil de usar, porque o mesmo não mede benefícios relativos ao montante investido. Ao contrário, a TIR dá muito mais informações sobre os retornos relativos ao investimento inicial.

Em suma, constata-se que, embora o VPL seja teoricamente preferível, a TIR é mais popular pelo fato de se poder relacioná-la diretamente aos dados disponíveis de decisão. No presente estudo serão consideradas as duas técnicas de análise econômica para análise do desempenho financeiro das plantas.

## **Ferramentas computacionais**

Existem várias ferramentas computacionais para a resolução dos sistemas de equações resultantes da formulação dos problemas de plantas de cogeração, e no caso específico será efetuada pelo programa EES<sup>®</sup> (Engineering Equation Solver), desenvolvido por Klein e Alvarado (1995), e/ou pelo programa IPSEpro<sup>®</sup>, desenvolvido pela Simtech Ipsepro (2003). Maiores informações sobre esses programas podem ser obtidas, respectivamente, em <<http://www.fchart.com/ees>> e em <<http://www.simtechnology.com>>.

## **Estudos desenvolvidos no Nuplen na área de cogeração no setor sucroalcooleiro**

A seguir serão apresentados três exemplos de pesquisas aplicadas, desenvolvidas no setor sucroalcooleiro, no âmbito do Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen) do Departamento de Engenharia Mecânica da Unesp de Ilha Solteira, os quais serviram ou servirão de base para implantação de novos projetos ou melhoria da efi-



ciência dos projetos existentes. Maiores informações sobre essas pesquisas podem ser obtidas, respectivamente, nas seguintes referências: Fiomari (2004), Romão Júnior (2009) e Passolongo (2011).

## Análise do efeito do aumento dos níveis de pressão e temperatura e da eletrificação das moendas na produção energia numa usina sucroalcooleira

### Introdução e objetivos

Com o advento da cogeração e a possibilidade de exportação de energia elétrica, além da competitividade do mercado, as usinas passaram a se preocupar com o consumo de vapor de processo, na substituição de acionamentos mecânicos de baixa eficiência (turbinas a vapor de simples estágio) por motores elétricos, na readaptação das turbinas de simples estágio para múltiplos estágios e na geração de energia elétrica por meio de máquinas térmicas mais eficientes, ou seja, de múltiplos estágios, podendo ou não ser de extração-condensação.

Com o grande desenvolvimento tecnológico tem sido crescente o aumento dos níveis de pressão e temperatura nos equipamentos (caldeiras e turbinas a vapor), passando dos modestos valores de 21 bar e 300°C usados na década de 1970 para até 118 bar e 530°C nos novos projetos em desenvolvimento.

A Figura 20.5 mostra os ganhos energéticos associados ao aumento dos níveis de pressão e temperatura, segundo a fabricante de turbinas TGM.

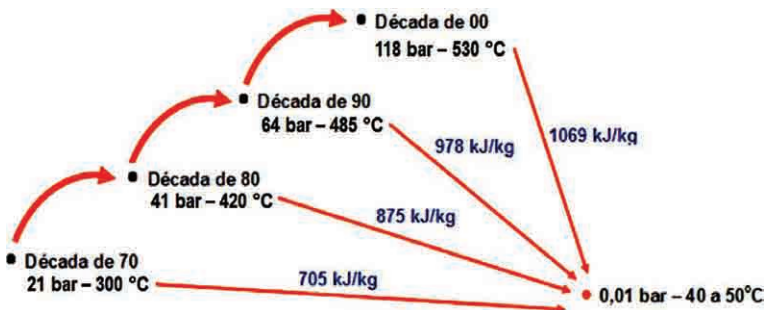


Figura 20.5 – Evolução e ganhos devido à pressão e temperatura

Fonte: TGM.

No Gráfico 20.4 é mostrado o consumo específico de vapor em razão dos níveis de pressão e temperatura, de acordo com a fabricante de turbinas TGM. Verifica-se que existe uma redução considerável com o aumento desses parâmetros, com conseqüente aumento da produção de eletricidade.

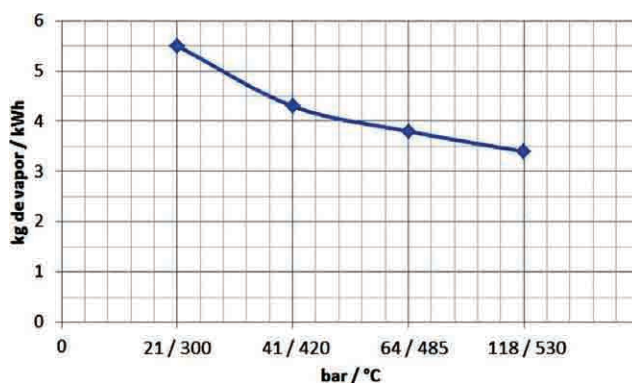


Gráfico 20.4 – Consumo específico em função da pressão e temperatura

Fonte: TGM

Diante desse contexto, nesta seção é mostrada uma análise evolutiva dos sistemas de cogeração de energia de uma usina da região noroeste paulista visando o aumento da produção de energia para comercialização, sendo verificados os efeitos do aumento dos níveis de pressão e temperatura e da eletrificação dos acionamentos mecânicos.

### Revisão bibliográfica

A seguir serão destacados alguns trabalhos relacionados à cogeração no setor sucroalcooleiro com destaque para as alternativas/tecnologias que visam à produção de excedentes de energia elétrica para comercialização.

Walter (1994) tratou da cogeração e da produção independente de eletricidade, como formas de geração descentralizada de energia elétrica e, em especial, da viabilidade e das perspectivas dessas tecnologias junto ao setor sucroalcooleiro no Brasil, levando-se em conta a expansão da agroindústria canieira. Foram analisadas várias alternativas de geração elétrica em larga escala e determinadas as principais características técnicas de cada sistema, tais como: a capacidade de geração, a produção de energia elétrica, a disponibilidade de excedentes e a demanda de biomassa. Esses resultados permi-

tiram identificar o potencial das tecnologias de maior viabilidade técnica e econômica, a partir da consideração de cenários alternativos de crescimento da produção de cana no estado de São Paulo e da identificação das usinas mais adequadas para isso.

Barreda del Campo et al. (1998) estudaram o sistema de cogeração de uma usina sucroalcooleira que fornece excedentes de energia para a rede elétrica. Eles realizaram uma comparação das eficiências de primeira e segunda leis, mostrando a utilidade desta última na avaliação de um sistema real, e como elemento importante para decisão de melhorias das plantas térmicas, ao evidenciar os equipamentos de maiores irreversibilidades e, conseqüentemente, a perda de oportunidades de geração de energia elétrica.

Higa e Bannwart (2002) realizaram algumas simulações e análises térmicas de uma planta produtora de açúcar e álcool visando otimizar a produção de excedente de energia elétrica e encontrar a melhor forma de recuperação de calor e integração térmica do processo. Foram consideradas diferentes tecnologias de cogeração e de arranjos de evaporadores de múltiplos efeitos. Os resultados obtidos demonstraram que diferentes configurações requeriam também diferentes medidas e estabeleceram algumas prioridades, que podem ser adotadas em diversos níveis de investimentos econômicos. Além das diferenças na integração da usina no sistema de cogeração para a economia de bagaço, ou para o aumento da geração de energia elétrica excedente, foi possível concluir que as medidas para alcançar esses objetivos devem ser priorizadas de acordo com o consumo de vapor de processo e a integração de evaporadores de múltiplos efeitos.

Lobo et al. (2002) analisaram os processos de extração de duas usinas sucroalcooleiras que usam turbinas de contrapressão para fornecer trabalho, sendo o vapor de contrapressão utilizado como energia térmica de processo. Uma das usinas emprega grandes turbo geradores de múltiplos estágios, que operam com entrada de vapor a 3,0 MPa e 330 °C, para cogear energia elétrica para motores elétricos que acionam as moendas, picadores e desfibradores. Já na outra usina, o acionamento das máquinas é feito diretamente por pequenas turbinas de simples estágio operando com vapor a 2,0 MPa e 290 °C. Foi verificado que a usina que usa energia elétrica cogorada, com turbinas maiores para acionar as máquinas, chega a economizar 65% de bagaço gasto para moer uma tonelada de cana quando comparada com

a usina que usa várias turbinas menores e menos eficientes. Concluiu-se que, com o uso mais racional do bagaço gerando vapor em temperaturas e pressões maiores, obtém-se uma grande economia de bagaço, que pode ser comercializado ou usado para geração de excedente de eletricidade.

Jaguaribe et al. (2002) realizaram um estudo termodinâmico e avaliaram as condições técnicas das instalações a serem implantadas em um sistema de cogeração de energia de uma destilaria. A ampliação proposta não teve o objetivo apenas de tornar a destilaria autossuficiente em termos de energia, mas também tornar possível exportar 33.616 MWh durante a safra e 3.600 MWh na entressafra. Foram considerados todos os custos envolvidos e os resultados mostraram que de imediato o negócio pode não ser atrativo, mas se houver uma elevação do preço de venda da eletricidade, o novo sistema de cogeração com venda de energia seria mais rentável.

Lobo et al. (2007) fizeram uma análise econômica de modificações propostas no processo de moagem de uma usina sucroalcooleira de médio porte antiga, levando-se em conta o consumo de energia envolvido no processamento da cana, bem como a eficiência de extração de açúcar. Essas modificações incluíram o uso de acionamento elétrico direto e maior imbebição em água durante o esmagamento para aumentar a extração do caldo. Embora mais energia seja gasta nessas condições, e tanto a umidade do bagaço como a diluição do caldo sejam maiores, usando turbinas modernas para acionamento dos geradores, nota-se que o consumo do vapor aumenta muito pouco e ocorre uma redução no consumo de bagaço. Foram obtidos os custos do bagaço e da eletricidade consumida para o acionamento extra, bem como o aumento da renda com maior produção de açúcar.

Kamate e Gangavati (2009) apresentaram uma análise exérgica de uma planta de cogeração típica de uma usina que processa 2.500 toneladas de cana por dia, utilizando turbinas de contrapressão e de extração-condensação. A configuração com turbinas de extração-condensação se mostrou mais eficiente do ponto de vista da exergia. As análises mostraram que a caldeira é o componente que mais contribuiu para a ineficiência da planta, pela sua natureza intrínseca. Verificou-se que uma caldeira moderna com a tecnologia atual poderia utilizar apenas 37% da exergia química do combustível na geração de vapor, de forma que 63% dessa exergia é perdida na combustão irreversível.

## Definição dos casos estudados

No presente estudo, serão realizadas análises energética e exergética de três configurações de plantas de vapor baseadas na expansão do sistema de cogeração de uma usina da região noroeste paulista no período de 2003 a 2007.

A configuração inicialmente considerada (Caso 1) é constituída por duas caldeiras que geram vapor em baixos níveis de pressão e temperatura (2.156 kPa e 290°C), com turbinas de simples estágio para geração de eletricidade (1,2 MW cada) e com picador, desfibrador e moendas com acionamento mecânico.

A configuração intermediária (Caso 2) consiste na substituição das caldeiras de baixa pressão por uma única caldeira que produz vapor em níveis maiores de pressão e temperatura (6.468 kPa e 530°C) e das turbinas geradoras de eletricidade de simples estágio por uma única turbina de extração-condensação de múltiplos estágios (32 MW), mantendo-se as outras turbinas de acionamento mecânico, e as turbinas da bomba de alimentação de água da caldeira, do Gerador T e do exaustor não operam, porém estão instaladas e podem eventualmente entrar em operação.

Por fim, o Caso 3 trata de uma configuração da planta com eletrificação total no acionamento de seus equipamentos na qual o turbo gerador A, mais eficiente, tem preferência no vapor produzido, enquanto o turbo gerador T funciona somente se for necessário produzir mais vapor de baixa pressão para o processo, evitando-se o uso de uma válvula redutora de pressão.

Na Tabela 20.3 são apresentadas as características de operação de cada um dos casos considerados.

Dentre os dados apresentados na Tabela 20.3, mediante a comparação entre os Casos 1 e 2, pode ser verificado o efeito do aumento dos níveis de pressão e temperatura, e mediante a comparação dos Casos 2 e 3, pode ser verificado o efeito da eletrificação dos acionamentos sobre a produção de eletricidade.

As Figuras 20.6 a 20.8 mostram, respectivamente, as plantas para os Casos 1 a 3, sendo a vazão mássica ( $\dot{m}$ ), a temperatura ( $T$ ), a pressão ( $P$ ), a entalpia ( $h$ ) e a entropia ( $s$ ) específicas nos pontos indicados, são apresentadas nas Tabelas 20.4 a 20.6, respectivamente.

Tabela 20.3 – Dados de operação da usina que passou por *retrofit*

Parâmetros	Caso 1	Caso 2	Caso 3
Cana moída total (t)	1.100.000	1.300.000	1.400.000
Dias de safra	215	215	225
Eficiência agrícola (%)	97,0	97,0	97,0
Eficiência industrial	92,4	94,0	94,0
Horas efetivas de moagem	4.609	4.695	4.914
Moagem horária (t/h)	237,0	276,9	284,9
Relação bagaço-vapor (kg/kg)	0,52	0,47	0,47
Pressão do vapor gerado (kPa)	2.156	6.468	6.468
Temperatura do vapor gerado (°C)	300	530	530
Teor de fibra da cana (%)	12,6	13,5	13,5
Teor de fibra do bagaço (%)	46,2	47,4	47,4
Fluxo de bagaço na caldeira AZ (t/h)	26,0	–	–
Fluxo de bagaço na caldeira SZ (t/h)	37,4	–	–
Fluxo de bagaço na caldeira MC (t/h)	–	70,5	70,5
Fluxo de bagaço residual (t/h)	1,3	8,4	10,6
Bagaço total residual da safra (t)	5.856	39.213	52.297
Capacidade nominal dos geradores 1, 2 e 3 (kW)	1.200	–	–
Capacidade nominal do gerador A (kW)	–	32.000	32.000
Capacidade nominal do gerador T (kW)	–	5.000	5.000

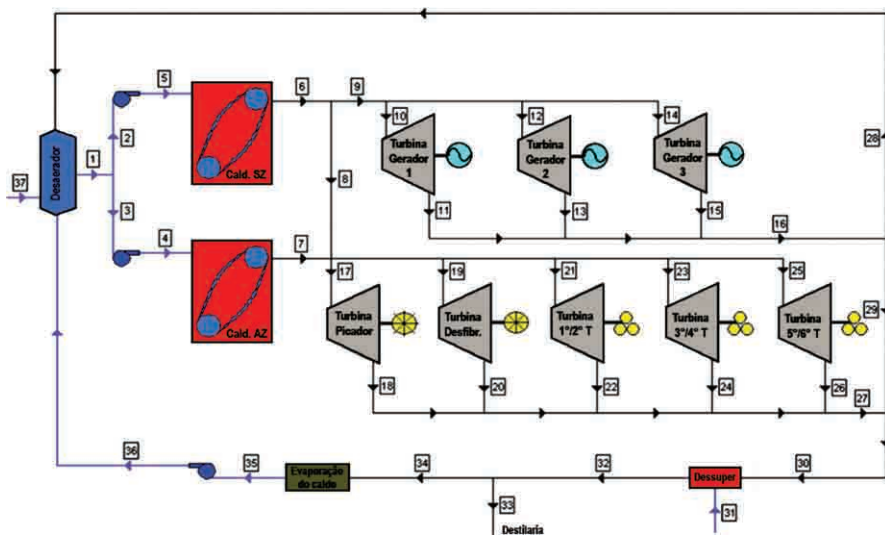


Figura 20.6 – Representação esquemática da planta com produção de vapor com baixos níveis de pressão e temperatura e com acionamentos mecânicos – Caso 1

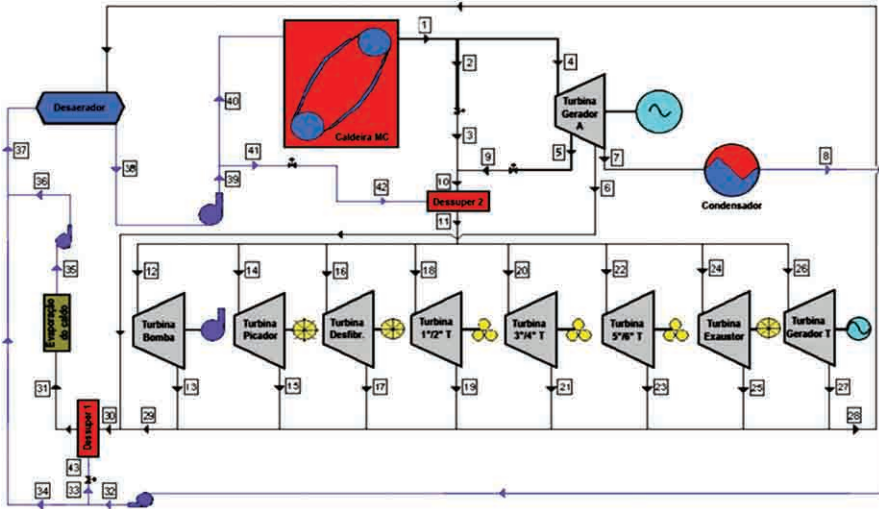


Figura 20.7 – Representação esquemática da planta com produção de vapor com altos níveis de pressão e temperatura e com acionamentos mecânicos – Caso 2

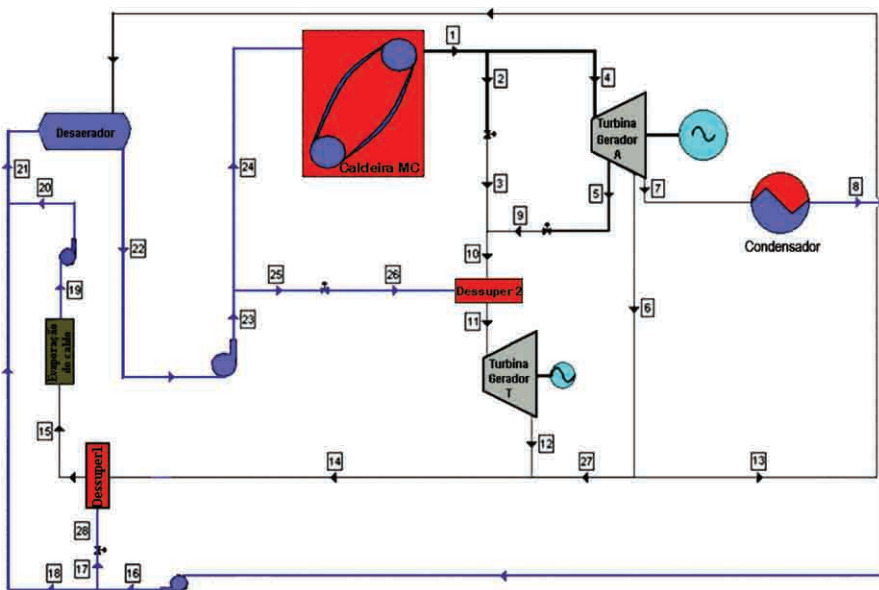


Figura 20.8 – Representação esquemática da planta com produção de vapor com altos níveis de pressão e temperatura e com acionamentos elétricos – Caso 3

Tabela 20.4 – Parâmetros de operação da planta do Caso 1

Pontos	$\dot{m}$ (t/h)	P (kPa)	T (°C)	h (kJ/kg)	s (kJ/kg.K)
1	122,0	245	105,0	440,3	1,363
2	72,0	245	105,0	440,3	1,363
3	50,0	245	105,0	440,3	1,363
4	50,0	3.332	105,3	444,9	1,367
5	72,0	3.332	105,3	444,9	1,367
6	72,0	2.156	290,0	2.994,4	6,683
7	50,0	2.156	290,0	2.994,4	6,683
8	10,9	2.156	290,0	2.994,4	6,683
9	61,1	2.156	290,0	2.994,4	6,683
10	20,4	2.156	290,0	2.994,4	6,683
11	20,4	245	170,0	2.806,6	7,275
12	20,4	2.156	290,0	2.994,4	6,683
13	20,4	245	170,0	2.806,6	7,275
14	20,4	2.156	290,0	2.994,4	6,683
15	20,4	245	170,0	2.806,6	7,275
16	61,1	245	170,0	2.806,6	7,275
17	12,2	2.156	280,0	2.970,3	6,639
18	12,2	245	155,0	2.775,6	7,204
19	12,2	2.156	280,0	2.970,3	6,639
20	12,2	245	155,0	2.775,6	7,204
21	12,5	2.156	280,0	2.970,3	6,639
22	12,5	245	164,0	2.794,2	7,247
23	12,0	2.156	280,0	2.970,3	6,639
24	12,0	245	164,0	2.794,2	7,247
25	12,0	2.156	280,0	2.970,3	6,639
26	12,0	245	164,0	2.794,2	7,247
27	60,9	245	160,4	2.786,8	7,230
28	6,0	245	170,0	2.806,6	7,275
29	55,1	245	170,0	2.806,6	7,275
30	116,0	245	164,9	2.796,2	7,251
31	2,8	245	25,0	105,0	0,367
32	118,8	245	135,0	2.733,5	7,103
33	40,0	245	135,0	2.733,5	7,103
34	78,8	245	135,0	2.733,5	7,103
35	78,8	245	100,0	419,2	1,307
36	78,8	490	100,1	419,6	1,307
37	37,2	245	25,0	105,0	0,367



Tabela 20.5 – Parâmetros de operação da planta do Caso 2

Pontos	$\dot{m}$ (t/h)	$P$ (kPa)	$T$ (°C)	$h$ (kJ/kg)	$s$ (kJ/kg.K)
1	150,0	6.468	530,0	3.488,5	6,931
2	29,3	6.468	530,0	3.488,5	6,931
3	29,3	2.156	510,2	3.488,5	7,424
4	120,7	6.468	530,0	3.488,5	6,931
5	36,0	2.650	426,0	3.295,1	7,070
6	64,0	245	147,2	2.759,3	7,165
7	20,7	8,5	42,7	2.578,2	8,205
8	20,7	8,5	42,6	178,4	0,607
9	36,0	2.156	422,7	3.295,1	7,163
10	65,3	2.156	462,0	3.381,9	7,284
11	73,2	2.156	320,0	3.064,8	6,804
12	0,0	–	–	–	–
13	0,0	–	–	–	–
14	14,7	2.156	310,0	3.041,6	6,765
15	14,7	245	185,0	2.837,3	7,343
16	14,7	2.156	310,0	3.041,6	6,765
17	14,7	245	185,0	2.837,3	7,343
18	15,0	2.156	310,0	3.041,6	6,765
19	15,0	245	194,5	2.856,6	7,385
20	14,4	2.156	310,0	3.041,6	6,765
21	14,4	245	194,5	2.856,6	7,385
22	14,4	2.156	310,0	3.041,6	6,765
23	14,4	245	194,5	2.856,6	7,385
24	0,0	–	–	–	–
25	0,0	–	–	–	–
26	0,0	–	–	–	–
27	0,0	–	–	–	–
28	3,0	245	190,7	2.848,8	7,368
29	70,2	245	190,7	2.848,8	7,368
30	134,2	245	169,8	2.806,1	7,274
31	138,0	245	135,0	2.733,5	7,103
32	20,7	490	42,7	179,3	0,608
33	3,8	490	42,7	179,3	0,608
34	16,9	490	42,7	179,3	0,608
35	138,0	245	100,0	419,2	1,307
36	138,0	490	100,1	419,6	1,307
37	154,9	490	93,8	393,4	1,237
38	157,9	245	105,0	440,3	1,363

Continua

Tabela 20.5 – Continuação

Pontos	$\dot{m}$ (t/h)	P (kPa)	T (°C)	h (kJ/kg)	s (kJ/kg.K)
39	157,9	8.820	106,8	454,1	1,376
40	150,0	8.820	106,8	454,1	1,376
41	7,9	8.820	106,8	454,1	1,376
42	7,9	2.156	107,8	454,1	1,394
43	3,8	245	42,8	179,3	0,609

Tabela 20.6 – Parâmetros de operação da planta do Caso 3

Pontos	$\dot{m}$ (t/h)	P (kPa)	T (°C)	h (kJ/kg)	s (kJ/kg.K)
1	150,0	6.468	530,0	3.488,5	6,931
2	10,0	6.468	530,0	3.488,5	6,931
3	10,0	2.156	510,2	3.488,5	7,424
4	140,0	6.468	530,0	3.488,5	6,931
5	0,0	–	–	–	–
6	120,0	245	134,5	2.732,5	7,101
7	20,0	7,2	39,6	2.572,6	8,264
8	20,0	7,2	39,5	165,4	0,566
9	0,0	–	–	–	–
10	10,0	2.156	510,2	3.488,5	7,424
11	11,5	2.156	330,0	3.087,8	6,843
12	11,5	245	164,5	2.795,3	7,249
13	3,5	245	134,5	2.732,5	7,101
14	128,0	245	137,2	2.738,1	7,114
15	128,2	245	135,0	2.733,5	7,103
16	20,0	490	39,6	166,3	0,567
17	0,2	490	39,6	166,3	0,567
18	19,8	490	39,6	166,3	0,567
19	128,2	245	100,0	419,2	1,307
20	128,2	490	100,1	419,6	1,307
21	148,0	490	92,0	385,8	1,216
22	151,5	245	105,0	440,3	1,363
23	151,5	8.820	106,8	454,1	1,376
24	150,0	8.820	106,8	454,1	1,376
25	1,5	8.820	106,8	454,1	1,376
26	1,5	2.156	107,9	454,1	1,394
27	116,5	245	134,5	2.732,5	7,101
28	0,2	245	39,7	166,3	0,568

## Resultados

A Tabela 20.7 mostra as eficiências, bem como a potência gerada, a taxa de irreversibilidade e o consumo específico de vapor nas turbinas. Nas Tabelas 20.8 e 20.9 são apresentados, respectivamente, o calor transferido nos processos, e a potência consumida e a irreversibilidade nas bombas. Na Tabela 20.10 são mostradas as eficiências das primeira e segunda leis para as caldeiras. Por fim, na Tabela 20.11 são mostrados alguns índices de desempenho da planta térmica e de potência da usina considerada.

Tabela 20.7 – Eficiências, potência, taxa de irreversibilidade e consumo específico nas turbinas

Caso 1					
Equipamento	$\eta_{II}$ (%)	$\eta_{II}$ (%)	$\dot{W}$ (kW)	$i$ (kW)	$R_{\text{vap,pot}}$ (kg/kWh)
Picador/Desfibrador	46,1	53,7	660	570	18,5
Moendas (1°/2° T)	41,7	49,3	611	629	20,4
Moendas (3°/4° T)	41,7	49,3	587	603	20,4
Moendas (5°/6° T)	41,7	49,3	587	603	20,4
Turbogerador 1, 2, 3	43,7	51,6	1.063	999	19,2
Turbogerador T	–	–	–	–	–
Turbogerador A	–	–	–	–	–
Caso 2					
Equipamento	$\eta_{II}$ (%)	$\eta_{II}$ (%)	$\dot{W}$ (kW)	$i$ (kW)	$R_{\text{vap,pot}}$ (kg/kWh)
Picador/Desfibrador	46,1	54,3	834	704	17,6
Moendas (1°/2° T)	41,7	50,0	771	770	19,5
Moendas (3°/4° T)	41,7	50,0	740	739	19,5
Moendas (5°/6° T)	41,7	50,0	740	739	19,5
Turbogerador 1, 2, 3	–	–	–	–	–
Turbogerador T	63,8	70,5	–	388	12,5
Turbogerador A	80,3	84,0	20.132	3.836	6,0
Caso 3					
Equipamento	$\eta_{II}$ (%)	$\eta_{II}$ (%)	$\dot{W}$ (kW)	$i$ (kW)	$R_{\text{vap,pot}}$ (kg/kWh)
Picador/Desfibrador	46,1	54,3	–	–	17,6
Moendas (1°/2° T)	41,7	50,0	–	–	19,5
Moendas (3°/4° T)	41,7	50,0	–	–	19,5
Moendas (5°/6° T)	41,7	50,0	–	–	19,5
Turbogerador 1, 2, 3	–	–	–	–	–
Turbogerador T	63,8	70,5	936	388	12,5
Turbogerador A	86,9	88,6	30.290	3.887	4,6

Tabela 20.8 – Transferência de calor nos processos

Processo	Caso 1	Caso 2	Caso 3
	Q(kW)	Q(kW)	Q(kW)
Evaporação do caldo	50.660	88.718	82.428
Destilaria	25.715	–	–
Condensação	–	13.799	13.374

Tabela 20.9 – Potência consumida e irreversibilidade nas bombas

Caso 1		
Bombas	$\dot{W}$ (kW)	$i$ (kW)
Bombas 1 e/ou 2	156,4	4,6
Bomba 3	9,3	3,7
Bomba 4	–	–
Caso 2		
Bombas	$\dot{W}$ (kW)	$i$ (kW)
Bombas 1 e/ou 2	605,0	211,7
Bomba 3	17,8	8,0
Bomba 4	5,1	2,3
Caso 3		
Bombas	$\dot{W}$ (kW)	$i$ (kW)
Bombas 1 e/ou 2	580,4	203,2
Bomba 3	16,6	7,4
Bomba 4	4,9	2,2

Tabela 20.10 – Eficiências termodinâmicas das caldeiras

Caldeiras	Caso 1		Casos 2 e 3	
	$\eta_I$ (%)	$\eta_{II}$ (%)	$\eta_I$ (%)	$\eta_{II}$ (%)
AZ e SZ	63,4	18,2	–	–
MC	–	–	83,5	28,8

Tabela 20.11 – Índices de desempenho da planta térmica e de potência da usina considerada

Índices de Desempenho	Caso 1	Caso 2	Caso 3
RPC – Razão Potência-Calor	0,082	0,271	0,379
$R_{\text{vapor,cana}}$ – Vapor Produzido / Cana Moída (kg/t)	501,2	498,6	450,1
$R_{\text{pot,cana}}$ – Potência Elétrica Produzida / Cana Moída (kWh/t)	13,5	72,7	109,6
$R_{\text{vap,ele}}$ – Vapor Consumido / Potência Elétrica Produzida (kg/kWh)	19,4	8,1	4,9
$R_{\text{bag,pot}}$ – Bagaço Consumido / Potência Total (kg/kWh)	10,1	2,9	2,3
$\eta_{\text{global}}$ – Eficiência Global da Planta (%)	60,5	64,5	65,8
$\dot{W}_{\text{ger,ele}}$ – Eletricidade Produzida (kW)	3.189	20.132	31.226

## Conclusões

Pelos resultados obtidos, foi verificado que as eficiências das caldeiras calculadas pela primeira lei são maiores que as obtidas pela segunda lei, independentemente da configuração. Isso ocorre em razão da sua própria definição que expressa a relação entre a energia útil absorvida pelo vapor e a energia do combustível. Diferentemente, a segunda lei estabelece uma relação entre a máxima potência que poderia ser extraída do vapor que deixa a caldeira e a exergia disponível do combustível, evidenciando as irreversibilidades presentes na combustão do bagaço e no processo de vaporização da água. De modo inverso, as turbinas apresentam eficiências de segunda lei superiores as de primeira lei, isso porque na primeira lei é considerado como referência um processo ideal reversível, enquanto na segunda lei a eficiência é calculada usando o fluxo real de exergia.

Com relação aos critérios de desempenho, foi verificado que todos os índices obtidos para a configuração final são favoráveis. A Razão Potência-Calor (RPC) aumenta significativamente por causa do aumento significativo da eficiência do gerador de energia elétrica e da exergia do vapor.

Com relação aos outros critérios tradicionalmente usados nas indústrias de cana-de-açúcar, que levam em conta o consumo da cana-de-açúcar e bagaço e as quantidades de vapor e potência produzidos, foi verificado que a configuração final é a que tem desempenho melhor, porque apresenta o consumo específico menor de vapor e de bagaço de cana-de-açúcar, além de ter uma geração de potência maior por tonelada de cana. Valores menores para as relações  $R_{vapor,cana}$ ,  $R_{vap,pot}$  e  $R_{bag,pot}$  indicam que a planta é mais eficiente; no entanto, se a planta for para cogeração de energia para exportação, é interessante que  $R_{pot,cana}$  seja o mais alto possível. Pode-se verificar que as relações  $R_{pot,cana}$  e  $R_{bag,pot}$  dependem das eficiências da caldeira e das turbinas que operam na planta, enquanto a relação  $R_{vap,pot}$  só é associada às eficiências das turbinas. Por sua vez, a energia térmica útil de processo é diretamente proporcional à relação entre  $R_{vapor,cana}$  e a quantidade da cana-de-açúcar usada. Essa relação é que define o ponto de operação da planta, porque as indústrias de cana-de-açúcar trabalham em paridade térmica.

É importante salientar que a turbina de extração-condensação tem seu ponto de operação definido em razão do consumo de vapor de processo considerado, de forma que para gerar mais potência é necessária a redução do consumo de vapor nos processos, reduzindo as extrações na turbina com

aumento consequente do volume condensado. A redução do consumo de vapor pode ser feita mediante modificações na planta da usina, tais como: arranjo do sistema de evaporação que começa a usar quatro efeitos além do pré-evaporador; uso de vapor vegetal nos outros aquecimentos do caldo; uso da energia térmica contida nos subprodutos de cana para troca de calor com o caldo; entre outras.

Diante do que foi exposto, e sabendo-se que a maior parte das usinas sucroalcooleiras brasileiras está enfrentando a necessidade de troca de equipamentos por estar no final de sua vida útil, essa seria uma excelente oportunidade para a introdução de equipamentos mais eficientes, que permitiriam não só o aumento da capacidade de moagem, mas também a geração de excedentes de eletricidade para comercialização.

Por sua vez, existe a possibilidade de que ocorra um incremento ainda maior na geração de energia no setor sucroalcooleiro se for feito o aproveitamento da palha que brevemente estará disponível no campo em maior quantidade em razão da tendência de mecanização da colheita e extinção da queimada, sendo esse assunto objeto de estudo na próxima seção.

## **Análise do efeito do aproveitamento da palha para queima em caldeira convencional numa usina sucroalcooleira**

### **Introdução e objetivos**

A queima da palha tem sido uma prática comum nas usinas para facilitar a colheita. Entretanto, a Unica, representando a indústria paulista produtora de açúcar, etanol e bioeletricidade, e o governo do estado de São Paulo, assinaram, no dia 4 de junho de 2007, o Protocolo Agroambiental do Setor Sucroalcooleiro Paulista. Esse protocolo, de adesão voluntária, estabeleceu uma série de princípios e diretrizes técnicas, de natureza ambiental, a serem observadas pelas usinas.

Por meio desse Protocolo Agroambiental, a maioria das usinas do setor sucroalcooleiro paulista se comprometeu a antecipar o cronograma de diminuição gradual das queimadas nas lavouras de cana no estado, anteriormente fixados pela Lei Estadual n.11.241/02. Até 2014, as usinas deverão eliminar 100% da queimada nas áreas mecanizáveis e, até 2017, o fogo deverá ser eliminado até mesmo nas áreas não mecanizáveis. O Gráfico 20.5

mostra o cronograma de diminuição das queimadas no estado de São Paulo, de acordo com o estabelecido pelo protocolo.

Com isso, os investimentos para colheita mecanizada e recuperação da palha para geração de energia tendem a se multiplicar nos próximos anos.

Diante desse contexto, nesta seção é analisada a possibilidade da utilização da palha como combustível suplementar para caldeiras convencionais de alta pressão (para bagaço), possibilitando, assim, um aumento de geração de energia excedente com a possibilidade de ser exportada para comercialização. São realizados estudos de perdas, ganhos e investimentos com a introdução da palha na indústria, mediante análises termodinâmicas de geração de energia; produção de álcool e açúcar; além das eficiências de equipamentos, como colhedoras de cana, sistema de lavagem de cana a seco, picador de palha, caldeira de alta pressão, dentre outros.

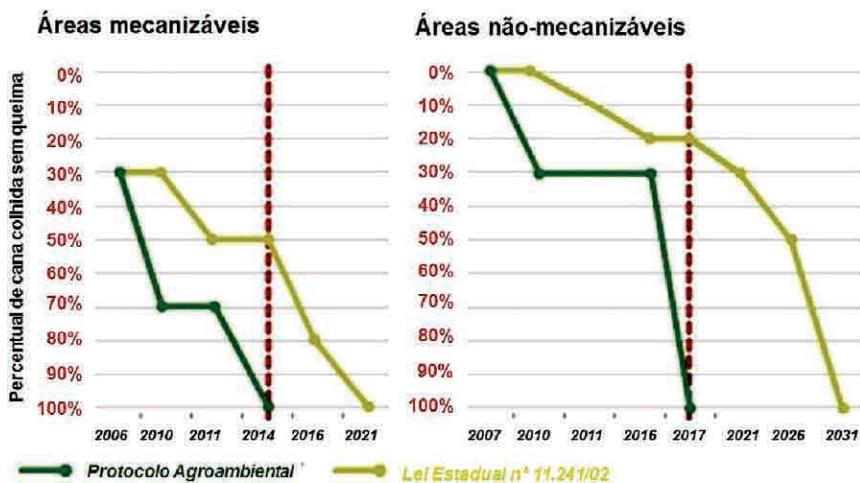


Gráfico 20.5 – Prazos para a eliminação da queima da palha no estado de São Paulo

Fonte: Unica (2008)

### Técnicas de limpeza da cana e recuperação da palha

A Figura 20.9 demonstra uma forma de colheita da cana-de-açúcar, onde se verifica que a maior parte da palha é eliminada no próprio campo. Obviamente que, mesmo com a colheita mecanizada, boa parte dela não será recuperada para produção de energia, devendo ainda continuar no campo para cobertura do solo e adubação.

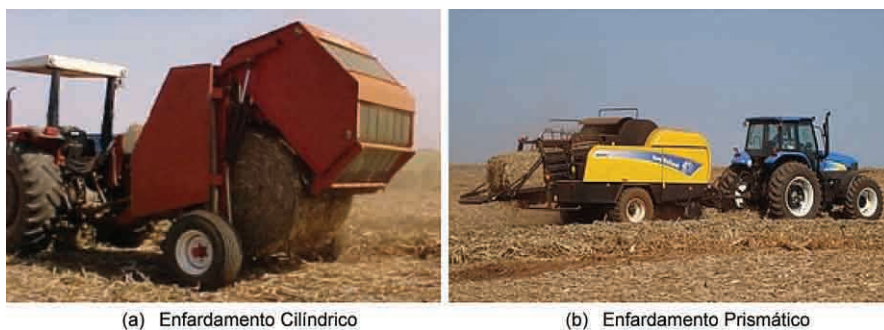


Figura 20.9 – Colheita mecanizada da cana-de-açúcar

Fonte: <<http://www.rankbrasil.com.br>>

Duas mudanças importantes podem ser apontadas nos processos atuais de recuperação da palha, as quais contribuiriam para acelerar seu aproveitamento energético, a saber: o aumento sua densidade no ato da colheita; a eliminação do manuseio intenso com seus correspondentes custos e a contaminação com terra.

A Figura 20.10 mostra dois sistemas de enfardamento para o transporte da palha deixada no campo.



(a) Enfardamento Cilíndrico

(b) Enfardamento Prismático

Figura 20.10 – Sistema de enfardamento da palha para transporte

Fonte: <<http://www.unica.com.br>>

A cana picada possui mais áreas de atração de impurezas, de modo que, se a usina for lavar a cana picada, a perda de açúcar será da ordem de 5%, tornando proibitiva essa medida. Para evitar grandes perdas de sacarose no processo industrial, é necessário separar essas impurezas e, atualmente, o



melhor sistema para realizar essa função é por meio do Sistema de Limpeza de Cana a Seco (SLCS).

O sistema de limpeza de cana a seco faz que um fluxo de ar, gerado por ventiladores instalados atrás ou sob a mesa de alimentação, atravesse a “cas-cata” de cana que vem da mesa alimentadora para a esteira de cana, eliminando as impurezas e separando a palha. Trata-se de uma solução já adotada por algumas usinas com bons resultados. Parte dessas unidades separa e manda para a lavoura a palha e a terra recolhida, já outras separam a palha da terra e a passam pela moenda. No entanto, o ideal é a utilização da palha como combustível suplementar para as caldeiras de bagaço, possibilitando um aumento de geração de energia excedente que pode ser exportada; porém, as palhas retiradas apresentam um inconveniente que é o fato de serem de tamanho grande e com fibras longas, por isso não são próprias para a queima direta nas caldeiras convencionais a bagaço. Faz-se necessária a utilização de um picador de palha para transformá-la em pequenos pedaços para que possa fazer a mistura com o bagaço e, depois, a queima nas caldeiras convencionais.

As Figuras 20.11 e 20.12 mostram, respectivamente, um esquema de um SLCS desenvolvido pelo CTC e uma foto de uma instalação na Usina Equipav.

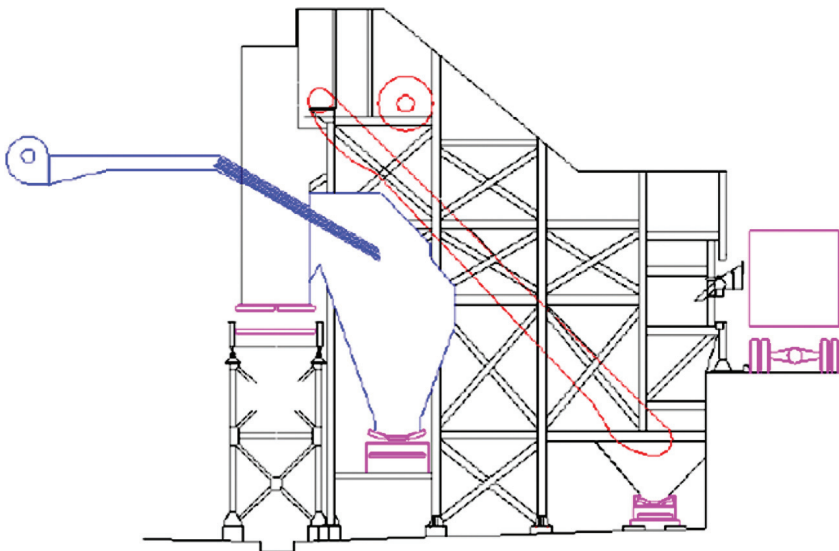


Figura 20.11 – Sistema de lavagem a seco de cana do CTC

Fonte: Centro de Tecnologia Canaveira (CTC)



Figura 20.12 – Sistema de lavagem a seco em uma usina sucroalcooleira

Fonte: Usina Equipav

### Revisão da bibliográfica

A seguir serão destacados alguns trabalhos relacionados ao recolhimento e aproveitamento da palha para queima em caldeira, bem como aos sistemas de limpeza de cana a seco.

Zulauf et al. (1985), para cálculo da energia liberada pela queima, consideraram valores entre 4% e 11,5% de palha e entre 6% e 16,2% de ponteiros. Os autores citam ainda valores encontrados em Cuba que, em 144 t de massa total (*in natura*), 28 t corresponderiam a ponteiros e 16 t seriam folhas verdes e folhas secas, o que equivaleria a 19,4 e 11,1%, respectivamente. Para determinação da energia gerada pela queima, foi determinado em laboratório o poder calorífico da palha que, corrigido pelo teor médio de umidade nas condições dos experimentos, chegou-se a um valor de 2.576 kcal/kg palha (poder calorífico inferior).

Ripoli et al. (1991) afirmaram que, com o aumento da colheita mecânica, as usinas que desejarem agregar valor por meio do aproveitamento da palha

tenderão a apresentar custos operacionais menores do que os atuais, pois as futuras colhedoras de cana picada, por exigência de mercado, poderão apresentar valores de aquisição por volta de 20% a 30% menores do que os atuais (por volta de US\$ 300 mil), visto que não mais apresentarão exaustores, ventiladores, além de menor número de motores hidráulicos, mangueiras e outros componentes e, com certeza, motores de combustão interna de menores potências. Com isso, afirmam que máquinas com tais características permitirão manutenções periódicas mais rápidas e mais baratas, levando-se a simplificação das estruturas de apoio do sistema de colheita.

Hassuani (1998) obteve um custo de US\$ 19,80 para recolhimento e transporte a 10 km para 1 t de palha seca enfardada. Considerando a produção de 11,2 t de resíduo seco por hectare e uma eficiência de recolhimento de palha de 50%, tem-se um custo aproximado de US\$ 110/ha para recolhimento e transporte da palha até a usina. Uma vez que essa palha possui um equivalente energético a 1.943 kg de óleo combustível a um custo aproximado de US\$ 125,00/t, pode-se evitar o gasto equivalente a US\$ 132,00 para cada hectare de resíduo recolhido. Esse raciocínio desconsidera custos de decomposição dos fardos.

Carpio et al. (1999) apresentaram critérios de avaliação termodinâmica para sistemas de cogeração em usinas de açúcar, analisando dois sistemas de cogeração, um com turbina de contrapressão operando a 2,1 MPa e 300°C e outro com turbina de extração-condensação operando a 8,0 MPa e 450°C. Foi analisada também a possibilidade do uso de combustíveis auxiliares (palha de cana, eucalipto e gás natural) para o período da entressafra, sendo determinado o custo de geração de eletricidade para cada caso. Foi concluído que o sistema com turbina de condensação e com duas extrações apresenta eficiência de 66,0% contra 42,0% do sistema de contrapressão, além de ter uma taxa de economia da energia do combustível quase sete vezes menor. Como alternativa de geração fora da safra, o gás natural foi o combustível que apresentou o menor custo seguido pela palha, se considerado custos de colheita e transporte inferiores a R\$ 25,00/ton.

Sánchez Prieto et al. (2001) argumentam que a cogeração tem uma grande aceitação no setor sucroalcooleiro, fundamentalmente em razão da sua adequação, pois o combustível empregado é um rejeito do processo de fabricação e os produtos do sistema, potência mecânica ou elétrica e vapor são utilizados no próprio processo.

Bohórquez *et al.* (2006) avaliaram a utilização integral do bagaço de cana-de-açúcar resultante do processo produtivo de uma usina de açúcar que pretende incrementar sua capacidade de geração de energia elétrica de 7 para 35 MW, mediante o redesenho do ciclo e a incorporação de novos turbogeradores. Com o uso de ferramentas termoeconômicas, foram estabelecidas a matriz de incidência da planta de cogeração, a determinação dos custos exergoeconômicos e a realização das simulações da variação do preço de combustível e a eficiência da caldeira. Além disso, foi efetuado um breve estudo econômico da produção de energia elétrica e da venda dos excedentes de 27 MWh médios, e concluído que o custo da eletricidade gerada era de US\$ 0,051/kWh.

Oliveira e Halmeman (2006) estudaram quais são as principais implicações do novo modelo do setor elétrico como alternativa para impulsionar a geração de energia, utilizando o bagaço da cana-de-açúcar no processo de cogeração. Os dados sobre as autorizações e registros das usinas termoe-létricas foram obtidos junto à Agência Nacional de Energia Elétrica, bem como as informações sobre processo de compra e venda da geração distribuída a partir da utilização do bagaço da cana junto às usinas que receberam autorização ou registro entre 2004 a 2005.

## Metodologia

Foi analisado um caso com dados reais para a possibilidade de utilização da palha como combustível suplementar na caldeira de alta pressão de uma usina sucroalcooleira do oeste paulista, e os dados necessários para os cálculos foram fornecidos da safra 2008/2009. Nessa safra, a moagem da referida usina foi de 1.817.674 toneladas de cana, e sua produção de álcool anidro e hidratado foram, respectivamente, 37.120 m<sup>3</sup> e 61.196 m<sup>3</sup>, e a produção de açúcar chegou a 114.472 toneladas (Unica). O mix de produção foi de 58,6% para álcool e os outros 41,4%, para açúcar

A porcentagem de mecanização da colheita é de 45%, sendo o restante manual e com o uso de queimadas; do total de cana disponível, 1.725.185 toneladas são referentes a colmo e 89.815 toneladas, referentes à palha, considerando que 55% da palha já foram queimados. Assim, a Tabela 20.12 mostra a quantidade de cana (colmo + palha) que chega à indústria, e a Tabela 20.13 mostra a quantidade de palha que é separada com o Sistema de Limpeza de Cana a Seco (SLCS) ligado.

Tabela 20.12 – Quantidade de cana entrando na indústria, com 45% da colheita mecanizada

Colhedora de cana (Ventilação)	Quantidade de colmo e palha
Ventilada	1.725.185 t_colmo
	17.980 t_palha
Parcialmente ventilada	1.725.185 t_colmo
	44.960 t_palha
Sem ventilação	1.725.185 t_colmo
	84.520 t_palha

Tabela 20.13 – Quantidade de palha separada pelo SLCS ligado

Tipo de ventilação	Palha (t)
Ventilada	7.364
Parcialmente ventilada	18.410
Sem ventilação	34.611

A partir do consumo total de energia necessário para o funcionamento da usina e a geração total energia, encontra-se a quantidade de energia que pode ser exportada em cada situação estudada.

## Resultados

A Tabela 20.14 mostra a exportação total de energia na usina, podendo ser verificado que a geração de energia aumenta com a maior introdução de palha na indústria e, conseqüentemente, a exportação de energia também aumenta. Assim, o Gráfico 20.6 apresenta a eficiência energética global dos indicadores estudados. Pode-se observar que, quando a colhedora trabalha com sua eficiência de ventilação baixa (Sem ventilação), a geração de energia aumenta relacionada à quantidade de cana que entra na indústria, isso ocorre por ter uma maior quantidade de palha preparada sendo queimada na caldeira, obtendo-se, assim, uma melhor eficiência de exportação de energia por quantidade de cana (114 kW/tcana). A menor eficiência da indústria ocorre quando a colheita é totalmente manual por meio de queimada da cana (80 kW/tcana) em razão da não utilização da palha como combustível suplementar para queima na caldeira, e por meio das análises é o principal motivo de uma melhor eficiência energética da indústria.

Tabela 20.14 – Geração total e exportação de energia (MWh/Safra)

Tipo de colheita	Tipo de ventilação	Geração total de energia	Exportação de energia
SLCS Ligado	Ventilada	236.964	150.352
	Parcialmente ventilada	260.345	171.134
	Sem ventilação	294.638	201.614
SLCS Desligado	Ventilada	232.614	146.883
	Parcialmente ventilada	249.471	161.168
	Sem ventilação	274.195	182.120
Colheita manual (queimada)		221.376	137.360

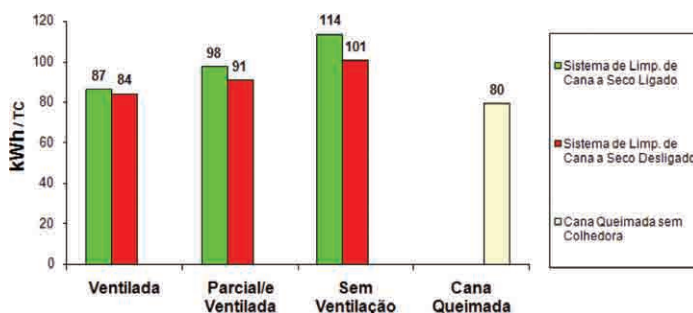


Gráfico 20.6 – Eficiência energética global

A receita final da utilização da palha como combustível complementar na caldeira é apresentado no Gráfico 20.7. Observa-se que, para a primeira safra, a usina terá o maior déficit, próximo a R\$ 4.060.000,00 quando o SLCS está desligado e a colhedora trabalhando com sua eficiência máxima de limpeza de palha no campo; porém, com o SLCS ligado e com uma maior quantidade de palha entrando na indústria e sendo utilizada para queima na caldeira, a usina pode pagar o investimento com o sistema e ainda ter um superávit de aproximadamente R\$ 1.960.000,00.

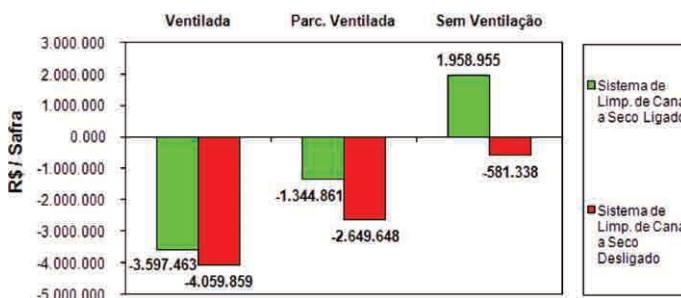


Gráfico 20.7 – Receita final com venda de energia excedente na primeira safra

O Gráfico 20.8 apresenta a rentabilidade da energia excedente exportada com a introdução da palha para queima na caldeira em safras, e a Tabela 20.15 apresenta alguns índices variando a porcentagem de mecanização da colheita da cana-de-açúcar considerando a melhor situação comparada ao modo de extração de palha das colhedoras (Ventilada, Parcialmente ventilada e Sem ventilação).

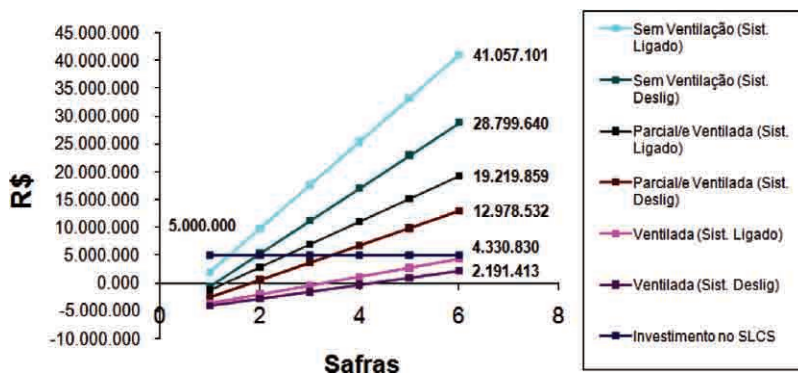


Gráfico 20.8 – Rentabilidade da energia excedente exportada

Tabela 20.15 – Melhor situação de extração da palha em função do percentual de mecanização da colheita (MWh/safra)

Melhor situação	Porcentagem de mecanização da colheita					
	15%	30%	45%	60%	75%	90%
Geração de energia (MWh/safra)	245.797	270.217	294.638	319.060	343.480	367.900
Exportação de energia (MWh/safra)	158.100	179.855	201.614	223.374	245.134	266.894
Eficiência energética global (kWh/tc)	91	102	114	125	136	146
Receita final (R\$)	-2.760.000	-400.000	1.960.000	4.317.871	6.676.787	9.035.702

## Conclusões

Os resultados obtidos mostram que a utilização da palha como combustível suplementar em caldeiras de alta pressão a bagaço pode ser bem vantajosa no sentido financeiro, aumentando consideravelmente a receita final da usina, além de gerar uma energia limpa e renovável, colaborando para suprir eventuais déficits de energia no Brasil.

Por sua vez, existe a possibilidade de que ocorra um incremento ainda maior na geração de energia no setor sucroalcooleiro se forem utilizadas tecnologias mais avançadas que permitam um melhor aproveitamento energético do combustível, tal como o processo de gaseificação da biomassa, ainda em fase de desenvolvimento, que será objeto de estudo na próxima seção.

## **Análise do efeito da integração de sistemas de gaseificação da biomassa na produção de energia numa usina sucroalcooleira**

### **Introdução e objetivos**

Além do bagaço de cana, outros subprodutos da indústria canavieira apresentam grande potencial para aproveitamento energético, como vinhaça e palha, por exemplo.

A vinhaça é um resíduo final da fabricação do álcool gerado em grande quantidade (cerca de 10 a 15 litros para cada litro de álcool produzido), e, no início da indústria sucroalcooleira no país, era comum seu descarte em águas de rios e lagos, pois não havia critério nem legislação a respeito. O potencial poluidor da vinhaça reside em sua elevada carga orgânica, o que faz que seja consumido rapidamente o oxigênio da água, ocasionando morte de peixes e uma série de outros problemas. Uma alternativa um pouco menos impactante consiste na aplicação do efluente nas lavouras de cana, com a finalidade de fertilizar o solo e, ao mesmo tempo, irrigar a cultura da cana-de-açúcar (fertirrigação). Essa prática permite uma redução dos custos com adubação mineral, além de proporcionar um aumento na produtividade agrícola. Projetos de pesquisa recentes estão permitindo novas alternativas de destino para a vinhaça, e umas delas é pelo processo de biodigestão anaeróbia, que propicia a diminuição da carga orgânica da vinhaça, produzindo o biogás da vinhaça, que pode ser aproveitado para geração de eletricidade. Esse processo apresenta algumas vantagens, como baixo consumo de energia, pequena produção de resíduo sólido e maior eficiência na diminuição da carga orgânica. Além disso, após passar por esse processo, a vinhaça não tem alterado o seu poder fertilizante, podendo ainda ser utilizada para fertirrigação, porém com um menor potencial poluidor.



A palha é um subproduto da cana-de-açúcar que estará disponível em abundância em virtude do processo gradual de extinção da queimada no setor sucroalcooleiro, conforme já mencionado anteriormente. Uma possibilidade de aproveitamento da palha recuperada, além da sua queima em caldeira, seria por meio da gaseificação, que é uma tecnologia de conversão termoquímica de um combustível sólido em um combustível gasoso, mediante a oxidação parcial da biomassa sob altas temperaturas, dando origem ao gás de biomassa. Embora esse biogás apresente um baixo poder calorífico, ele é gerado em grandes quantidades permitindo seu uso para fins energéticos.

Diante desse contexto, o objetivo desta seção é analisar, dos pontos de vista termodinâmico, termoeconômico e econômico, a integração de sistemas de gaseificação da palha e da vinhaça numa usina sucroalcooleira, considerando a queima do bagaço na caldeira para suprir a demanda de vapor da usina.

### **Tecnologias para produção de biogás no setor sucroalcooleiro**

A seguir, serão apresentados alguns aspectos relacionados à produção de biogás a partir da vinhaça e da palha, visando à sua posterior utilização em turbinas a gás para incremento da geração de energia nas usinas.

A gaseificação da biomassa sólida pode ser definida como um processo químico de conversão de sólido (fosseis, biomassa) em gás combustível de baixo poder calorífico, mediante a oxidação parcial a temperatura elevada. A mistura de gases quentes que sai do gaseificador é chamada de gás pobre por causa do seu baixo poder calorífico, em torno de 4,5 a 6,0 MJ/Nm<sup>3</sup>, correspondente a aproximadamente 10% do poder calorífico do gás natural. Projetos mais recentes já produzem gases que alcançam um poder calorífico da ordem de 30% do poder calorífico do gás natural.

Os principais componentes combustíveis do gás formado são o monóxido de carbono (CO), o hidrogênio (H<sub>2</sub>) e o metano (CH<sub>4</sub>), em percentuais que variam com o tipo de gaseificador, com as condições de operação e com a umidade da matéria-prima, conforme mostra a Tabela 20.16. Esses parâmetros determinam também o grau de contaminação do gás com alcatrões e partículas de fuligem. Não se verificam grandes variações na composição do gás quando utilizados diferentes tipos de gaseificadores, mesmo trabalhando com diferentes tipos de biomassa (Corrêa Neto, 2001).

Tabela 20.16 – Principais componentes do gás de acordo com o tipo de gaseificador

Componente	Unidades	Gaseificador atmosférico		Gaseificador pressurizado
		Ar	Vapor	(5-20 bar)
H <sub>2</sub>	% em volume	12,5	38,1	4,0-15,0
CO	% em volume	16,3	28,1	10,0-19,0
CO <sub>2</sub>	% em volume	13,5	21,2	14,0-19,0
CH <sub>4</sub>	% em volume	4,4	8,6	5,0-9,0
HC	% em volume	1,2	3,0	–
N <sub>2</sub>	% em volume	52,0	0	45,0-60,0
PCI	MJ/Nm <sup>3</sup>	5,1	13,2	3,5-6,5

As impurezas no gás podem alterar negativamente a vida útil de equipamentos industriais, que, geralmente, são de custo elevado. Portanto, é extremamente importante a minimização dessas impurezas a fim de otimizar o emprego do gás em ciclos combinados de gaseificação integrada.

Segundo Larson et al. (2001), gaseificadores de leito fluidizado são mais adequados à conversão de uma maior quantidade de biomassa, e sistemas com capacidade entre 10 e 20 t de biomassa por hora são operacionais. Eles são, também, mais flexíveis quanto às características do insumo, podendo ser empregados na conversão de biomassa com mínimas necessidades de processamento anterior à alimentação. Em razão dessas vantagens, além do controle mais fácil, eles têm sido empregados em quase todos os projetos de desenvolvimento de sistemas BIG-CC.

Por sua vez, além dos maiores custos operacionais, os problemas de adequação dos gases quanto à sua qualidade tendem a ser maiores. Em razão da própria natureza do processo, a quantidade de material particulado arrastada também tende a ser maior. Um segundo aspecto é que a maior temperatura de saída dos gases permite que os álcalis saiam ainda da fase gasosa, impondo dificuldades adicionais à limpeza (Pereira Júnior, 2001).

A Figura 20.13 apresenta um esquema do gaseificador em leito fluidizado.

Uma outra forma de aproveitamento de biogás no setor sucroalcooleiro seria por meio da biodigestão da vinhaça, a qual processa sua carga orgânica (DQO/DBO) gerando o biogás e vinhaça biodigerida com baixa carga orgânica, mas que mantém o seu poder fertilizante. A quantidade de matéria orgânica de um substrato é normalmente quantificada pelo valor de sua de-

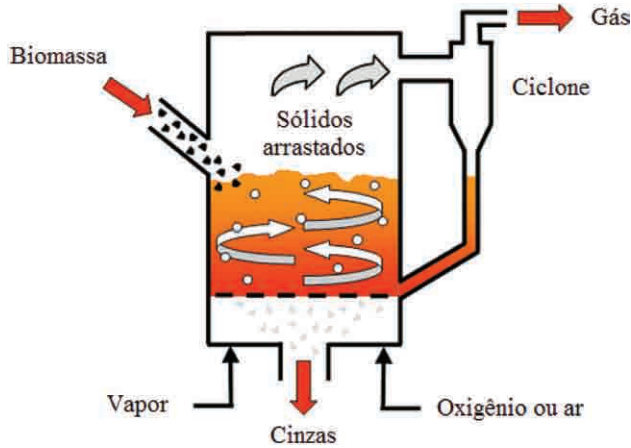


Figura 20.13 – Gaseificador de leito fluidizado

Fonte: Nogueira (2009)

manda bioquímica de oxigênio (DBO) ou sua demanda química de oxigênio (DQO), que determinam o oxigênio necessário para a degradação biológica e química, respectivamente, da matéria orgânica presente no substrato.

Considerando que uma tonelada de cana moída gera um metro cúbico de vinhaça, e que ocorre a geração de 7,2 kg de metano durante o processo de biodigestão de um metro cúbico de vinhaça, a energia química produzida seria da ordem de 100 kWh por tonelada de cana. Se essa energia for utilizada para produção de energia elétrica poderia haver um incremento de aproximadamente 20 kWh por tonelada de cana.

O processo de produção do biogás se inicia com o efluente a ser tratado sendo distribuído uniformemente na base do reator, passando pela camada de lodo, transformando a matéria orgânica em biogás. Na prática, por meio da vinhaça, obtém-se 0,30 litros de  $\text{CH}_4$ /gDQO consumida, e a proporção de  $\text{CH}_4$  no biogás é 55% a 65% (sendo o restante  $\text{CO}_2$ ). Como o biogás apresenta alguns contaminantes imediatamente após a sua produção, é necessário que seja feita uma depuração dele utilizando filtros, compressores, resfriadores, bombas e outros equipamentos.

Dentre os principais tipos de biodigestores existentes, o reator anaeróbio UASB (*Up Flow Anaerobic Sludge Blanket Reactors*) seria o mais indicado para aplicação no setor sucroalcooleiro, segundo Cortez et al. (2007), sendo esse representado esquematicamente na Figura 20.14.

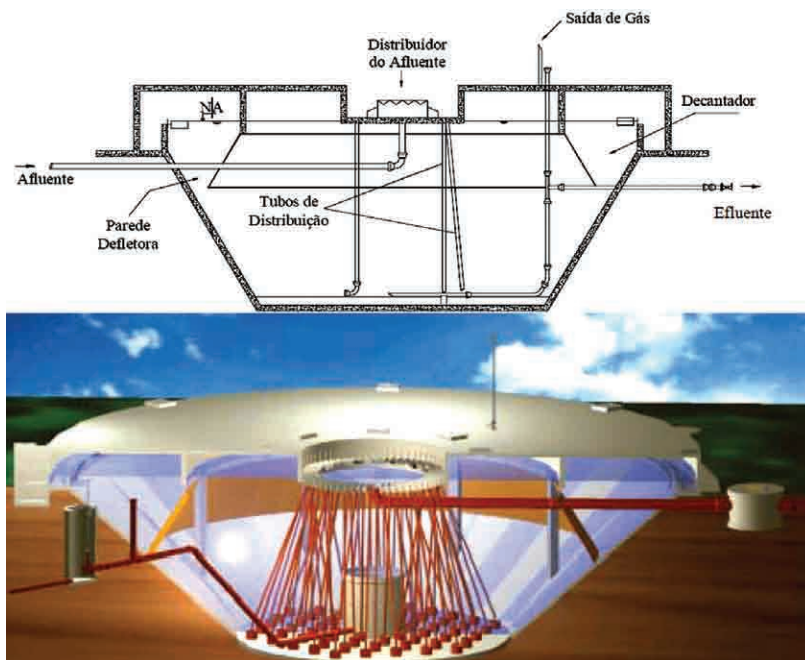


Figura 20.14 – Representação esquemática de um biodigestor tipo UASB

Fonte: Busato (2004)

### Revisão bibliográfica

A seguir, serão destacados alguns trabalhos relacionados à gaseificação da biomassa que contribuíram para o desenvolvimento do presente estudo.

Corrêa Neto (2001) avaliou a viabilidade técnica e econômica de projetos de geração de energia elétrica utilizando como combustível o bagaço, a palha e as pontas da cana-de-açúcar, como opção complementar à expansão do sistema elétrico brasileiro. A tecnologia analisada foi de geração termelétrica com ciclo combinado, operando em cogeração, integrado a sistemas de gaseificação de biomassa para a produção de gás combustível, com e sem adição de gás natural. A análise econômica foi feita por meio da modelagem e construção de curvas de economicidade do projeto, baseadas nos preços da energia elétrica, do gás natural e nos custos da biomassa.

Walter e Llagostera (2006) realizaram uma análise da viabilidade da utilização de ciclos combinados com *co-firing* baseado na gaseificação dos resíduos da cana-de-açúcar (bagaço e palha) e aproveitamento do gás natural. A análise foi baseada nos custos de investimento de capital e de operação

e manutenção de tais ciclos, levando em conta os custos atuais e de médio prazo das tecnologias BIG-CC (*Biomass Integrated Gasification – Combined Cycle*), ainda em desenvolvimento. Foi concluído que uma profunda redução dos custos de investimentos nas tecnologias de gaseificação, bem como do custo do gás natural, é ponto-chave para fazer a tecnologia BIG-CC competitiva ante as outras opções existentes no mercado para a produção de eletricidade, mas isso só vai ser conseguido com a implantação e aprimoramento de algumas pequenas e médias unidades experimentais.

Ensinas et al. (2006) analisaram diferentes opções de sistemas de cogeração em usinas sucroalcooleiras com objetivo principal de verificar as possibilidades do aumento da geração de eletricidade. Foram consideradas quatro opções, sendo a primeira a utilização da tradicional turbina de contrapressão; a segunda, a utilização de uma moderna turbina de extração-condensação; a terceira, a utilização de um gaseificador de bagaço, uma turbina a gás e uma caldeira de recuperação; e, por fim, a quarta, com configuração de ciclo combinado integrado com a gaseificação da biomassa. Vale destacar que a análise da potência das plantas foi realizada junto com a redução da demanda de vapor do processo de produção de açúcar, uma vez que esses dois sistemas estão interligados. Os resultados obtidos mostram que existe um potencial significativamente grande para o aumento da produção de eletricidade usando o bagaço e a palha da cana como combustíveis na entressafra, especialmente com ciclos a vapor com turbinas de extração-condensação.

Zanetti et al. (2006) apresentaram um sistema de cogeração de energia para uma usina sucroalcooleira, com utilização de bagaço de cana-de-açúcar e gás natural, visando maximizar a produção de eletricidade. Para esse sistema, propuseram diversas estratégias de operação para uma mesma utilidade, sendo uma delas a utilização de todo o bagaço na gaseificação e complementação de gás natural na turbina a gás de forma a atender a demanda de vapor da usina (sem queima de bagaço na caldeira de recuperação), e outra forma de operação com o envio de uma determinada quantidade de bagaço ao gaseificador para acionar uma turbina a gás, sendo o excedente queimado na caldeira de recuperação de forma a maximizar a quantidade de vapor produzida. Por fim, concluiu-se que a maximização da produção de energia elétrica implicaria o comprometimento do rendimento exergético do sistema, em razão do aumento das irreversibilidades na caldeira.

Ensinas et al. (2007) analisaram a redução da demanda de vapor no processo industrial de uma usina com acionamentos eletrificados e com sistema

de evaporação de cinco efeitos. Foram apresentadas quatro configurações de plantas, considerando desde plantas convencionais com turbina de compressão até a gaseificação do bagaço em ciclo combinado. Foi verificado que, para os ciclos de vapor tradicionais, uma quantidade significativa de bagaço excedente pode ser obtida com o processo de redução da demanda de vapor. Além disso, a gaseificação da biomassa se mostrou uma importante alternativa a longo prazo, permitindo um incremento de mais de 70% na geração de eletricidade.

Rodrigues et al. (2007) realizaram um estudo sobre a operação de turbinas a gás com combustíveis de baixo poder calorífico. Foram estudadas três estratégias de modificação nas turbinas, as quais são: o “*de-rating*” da turbina a gás, que consiste na redução da temperatura de chama dos gases, que deve ser feita de forma que seja alcançada uma razão de pressões adequada; a possibilidade da extração de uma fração de ar do compressor; e o redesenho da entrada do expensor. As duas últimas estratégias acarretam em melhor desempenho para o sistema, embora sejam soluções de longo prazo, sendo justificadas somente após o desenvolvimento do mercado da tecnologia BIG-GTCC (*Biomass Integrated Gasification – Gas Turbine Combined Cycle*).

Salomon (2007) realizou uma avaliação econômico-financeira e ambiental da utilização de tecnologias para a valorização energética do biogás, incluindo a possibilidade de negócios com a venda de créditos de carbono (MDL) relacionados à utilização do biogás no Brasil. Foram feitas análises da produção de biogás, a partir de um modelo teórico e de resultados experimentais, além da modelagem da produção de eletricidade a partir do biogás gerado, para diferentes temperaturas de operação do reator. As análises mostraram o grande potencial para geração de biogás por meio da vinhaça, mostrando também que os motores de combustão interna ainda se apresentam como a melhor opção de geração de eletricidade a partir do biogás.

Seabra (2008) investigou as opções tecnológicas envolvendo o aproveitamento do bagaço e da palha da cana considerando diversas tecnologias, como a geração de energia elétrica mediante a cogeração com ciclos a vapor (opção atualmente comercial), cogeração com gaseificação da biomassa integrada a ciclos combinados, além da produção de etanol por meio da hidrólise e produção de combustíveis a partir da gaseificação da biomassa. Foi avaliado que opções atualmente comerciais já propiciariam a geração de excedentes de energia elétrica superiores a 140 kWh/tc, com custos em tor-

no de R\$ 100,00/MWh, para os casos de cogeração com alta pressão e uso de alguma palha em conjunto com o bagaço. No entanto, é esperado que, no futuro, sistemas de cogeração com ciclos combinados integrando a gaseificação da biomassa deverão permitir que os níveis de excedentes ultrapassem os 200 kWh/tc, mas com custos também superiores (>140 R\$/MWh).

Pellegrini et al. (2010) apresentaram um estudo termodinâmico e termoeconômico comparativo de novas tecnologias para plantas de usinas sucroalcooleiras. As configurações estudadas compreendem ciclos a vapor supercríticos, com níveis de pressão e temperatura do vapor atingindo 300 bar e 600°C, respectivamente, e tecnologias para gaseificação da biomassa, considerando a gaseificação atmosférica e pressurizada. As tecnologias de ciclos supercríticos e gaseificação atmosférica permitiriam que a geração de eletricidade excedente atingisse cerca de 150 kWh/tc, ao passo que, com a gaseificação pressurizada, seria possível atingir até 202 kWh/tc de excedente de eletricidade. Além disso, o custo exergético da eletricidade gerada poderia ser reduzido em até 50% com o ciclo a vapor supercrítico, e em mais de 60% com a gaseificação pressurizada.

Dias et al. (2010) realizaram a simulação de plantas de usinas com otimização da demanda de vapor de processo utilizando conceitos da Análise Pinch. Diferentes sistemas de cogeração foram analisados: um ciclo Rankine simples, com turbinas de contrapressão; ciclo a vapor com turbina de condensação; e o sistema BIG-CC (*Biomass Integrated Gasification – Combined Cycle*), com gaseificação do bagaço da usina. A integração térmica permitiu a redução da demanda de vapor da usina para valores abaixo de 230 kg de vapor por tonelada de cana moída, em contraste com os valores típicos de 380 a 450 kg/tc do setor. O trabalho também mostrou a viabilidade do uso da tecnologia BIG-CC em plantas para produção de álcool anidro.

### **Descrição dos casos estudados**

Serão considerados cinco casos de estudo, os quais serão descritos na sequência.

#### **Caso 1 – Planta de cogeração convencional de uma usina sucroalcooleira existente**

O primeiro caso a ser estudado é uma planta convencional de uma usina sucroalcooleira do noroeste paulista, mostrada na Figura 20.15. A planta uti-

liza equipamentos modernos e eficientes, incluindo caldeira que produz 160 t/h de vapor a 68,6 bar e 530°C, sendo que 125 t/h desse vapor é consumido por uma turbina extração-condensação acoplada a um gerador de 32 MW. É feita uma extração de 97 t/h de vapor a uma pressão de 2,45 bar para o processo de evaporação do caldo, e o restante do vapor continua a expandir até a pressão de 0,07 bar, sendo então condensado. O restante do vapor (35 t/h) é direcionado a uma turbina de contrapressão, a qual está acoplada a um gerador de 12 MW. O vapor é descarregado a uma pressão de 2,45 bar e, também, destinado a atender a demanda de vapor do processo industrial.

Vale destacar ainda que o processo industrial atualmente consome 130 t/h de vapor (cerca de 450 kg de vapor por tonelada de cana moída), a uma temperatura de 135°C. Como a temperatura do vapor de escape é próxima de 160°C é necessário o uso de um dessuperaquecedor, cuja finalidade é reduzir a temperatura do vapor até um ponto próximo à saturação, através da injeção de uma determinada quantidade de água líquida a 38°C no vapor. Do ponto de vista energético não há perdas, pois a diminuição da energia em razão do abaixamento da temperatura é compensada pelo aumento da vazão de vapor que deixa o dessuperaquecedor.

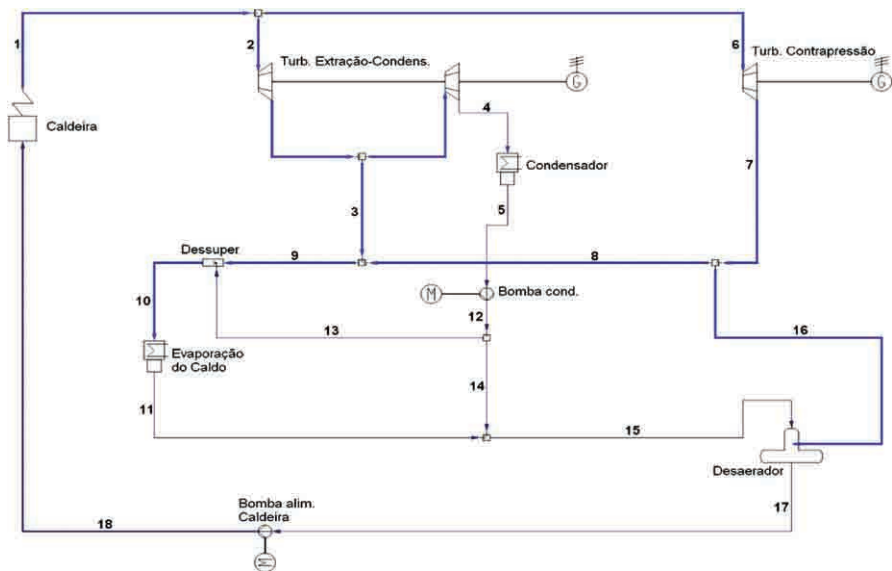


Figura 20.15 – Planta convencional de vapor de uma usina sucroalcooleira existente (Caso 1)



A Tabela 20.17 apresenta alguns dados da safra da usina considerada.

Tabela 20.17 – Dados de safra da usina considerada

Parâmetros	Valores	Unidades
Cana moída total	1.500.000	t
Dias de safra	240	dias
Moagem horária	286,0	t/h
Relação bagaço-vapor	0,47	kg/kg
Vazão de bagaço produzido	81,5	t/h
Vazão de bagaço na caldeira	75,2	t/h
Vazão de bagaço excedente	6,3	t/h
Vazão de vapor na caldeira	160,0	t/h
Consumo de vapor no processo	130,0	t/h

### Caso 2 – Planta de cogeração convencional de uma usina sucroalcooleira existente com a integração da gaseificação da vinhaça

Nesse caso é estudada uma configuração hipotética na qual é incorporado na planta do Caso 1 um sistema para gaseificação da vinhaça, conforme mostra a Figura 20.16.

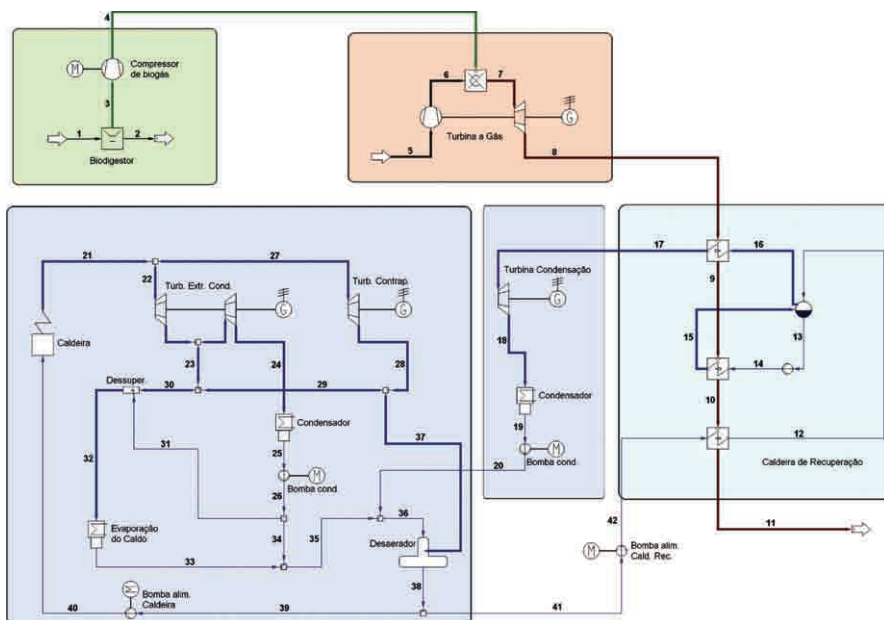


Figura 20.16 – Planta integrada para biodigestão da vinhaça numa usina existente (Caso 2)

Considerando que a produção de álcool da usina é cerca de  $14 \text{ m}^3/\text{h}$ , e que para cada  $\text{m}^3$  de álcool são produzidos  $13 \text{ m}^3$  de vinhaça, a vazão de vinhaça que pode ser aproveitada no biodigestor é de cerca de  $180 \text{ m}^3/\text{h}$ .

Nessa planta, o biogás gerado no biodigestor é aproveitado numa turbina a gás (modelo Rolls Royce 501 KB7, com razão de pressão de 13,5 e potência de 5,2 MW nas condições padrão) para geração de energia elétrica. O calor dos gases de exaustão da turbina é aproveitado numa caldeira de recuperação, gerando vapor para acionamento de uma turbina a vapor e condensador). O condensado dessa turbina se junta ao condensado do processo de fabricação e da turbina de extração-condensação, seguindo então para o desaerador térmico para retirar o oxigênio dissolvido na água.

### Caso 3 – Planta de cogeração convencional de uma usina sucroalcooleira existente com a integração da gaseificação da palha

No Caso 3 é estudada uma configuração hipotética, mostrada na Figura 20.17, na qual é inserido um sistema de gaseificação da palha da cana junto à planta da usina considerada no Caso 1, cujos dados de operação foram apresentados na Tabela 20.13.

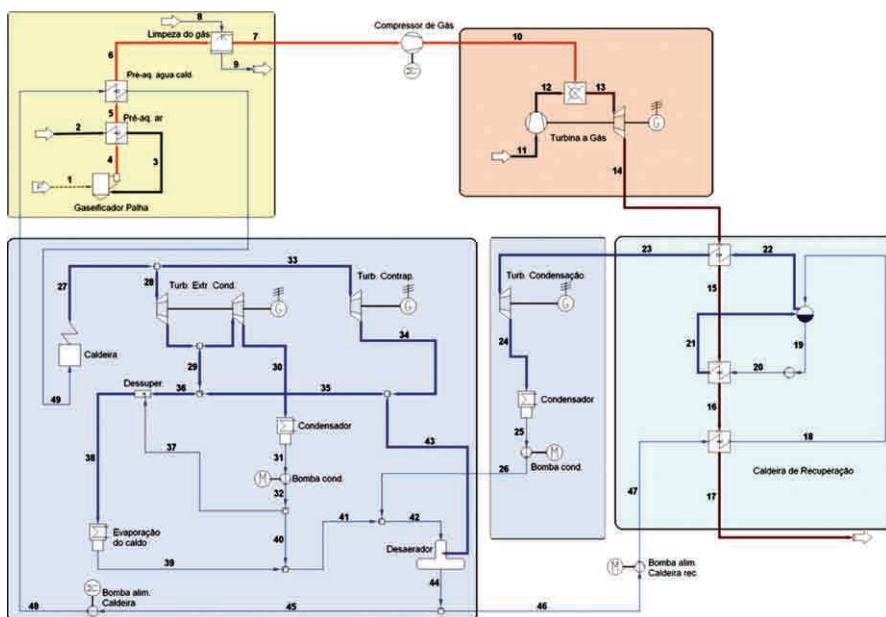


Figura 20.17 – Planta integrada para gaseificação da palha numa usina existente (Caso 3)

O sistema consiste de um gaseificador de palha, de uma turbina a gás acoplada a um gerador elétrico, uma caldeira de recuperação de calor e um sistema de vapor, composto por uma turbina de condensação, um condensador e a bomba de alimentação da caldeira de recuperação, além da planta tradicional de vapor da usina.

Segundo Romão Jr. (2009), a porcentagem de palha na cana é de aproximadamente 12%. Considerando uma colhedeira sem ventilação, é possível um aproveitamento de 94% da palha. No presente estudo, será considerado que 12% do total da palha deverão ficar no campo para fins de fertilização, de forma que, para uma vazão de 286 t/h de cana moída, a vazão de palha aproveitada para gaseificação seria cerca de 30 t/h.

O gaseificador considerado é de leito fluidizado circulante, trabalhando à pressão atmosférica. Como o gás é produzido a uma faixa de temperatura de 700 °C, é necessário realizar um resfriamento desse antes de ser comprimido. Assim, o gás passa por um pré-aquecedor de ar de gaseificação e por um trocador de calor, onde deve pré-aquecer a água de alimentação da caldeira. Esse pré-aquecimento da água da caldeira permite um aumento na vazão de vapor gerado de 160 t/h para 170 t/h, considerando que a caldeira não apresente uma redução em sua eficiência. Em seguida, o gás passa por mais um sistema de resfriamento com limpeza do gás para que possa ser comprimido e utilizado na turbina a gás.

A turbina a gás considerada é da Hitachi, modelo PG6561(B), com razão de pressão igual a 12,0; sendo a mesma acoplada a um gerador de 39,6 MW nominal. Os gases de exaustão dessa turbina passam por uma caldeira de recuperação de calor para produção de vapor, o qual é consumido em uma turbina de condensação, e o condensado se junta ao condensado do ciclo convencional a vapor para desaeração, sendo então bombeado de volta para a caldeira de recuperação.

#### Caso 4 – Planta de cogeração convencional de uma usina sucroalcooleira existente com a integração da gaseificação da palha e da vinhaça

O Caso 4 apresenta a configuração apresentada na Figura 20.18, a qual engloba a proposta de gaseificação da palha e da vinhaça na planta do Caso 1.

Os processos de gaseificação e biodigestão são os mesmos descritos nos Casos 2 e 3, respectivamente, e as vazões de palha e vinhaça no gaseificador e no biodigestor também são as mesmas (30,0 t/h de palha e 180 m<sup>3</sup>/h de

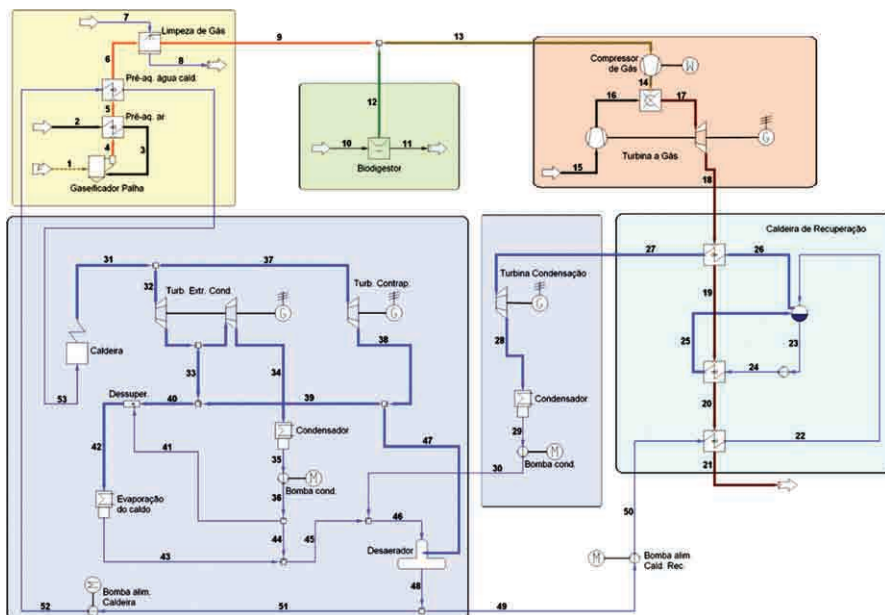


Figura 20.18 – Planta integrada para gaseificação da palha e vinhaça numa usina existente (Caso 4)

vinhaça). Considera-se nesse caso uma mistura do gás da palha e do biogás para consumo em uma única turbina a gás.

A turbina a gás considerada neste caso é da Siemens, modelo W251B11/12, com razão de pressão de 15,3, sendo ela acoplada a um gerador de 49,5 MW nominal. O aproveitamento dos gases de exaustão e a planta de vapor são similares aos Casos 2 e 3, com a diferença de que, nesse caso, se utiliza uma turbina de condensação maior para o ciclo combinado, uma vez que a vazão de gás para a turbina a gás será maior, de modo que a vazão dos gases de exaustão também assim o será.

### Caso 5 – Planta de cogeração modificada de uma usina sucroalcooleira idealizada com integração da gaseificação da palha e da vinhaça

O Caso 5, cuja planta é mostrada na Figura 20.19, consiste na concepção de uma usina nova, com o dobro da capacidade de moagem da usina considerada no Caso 1, e que considera a gaseificação da palha e da vinhaça da usina, tal como no caso anterior.

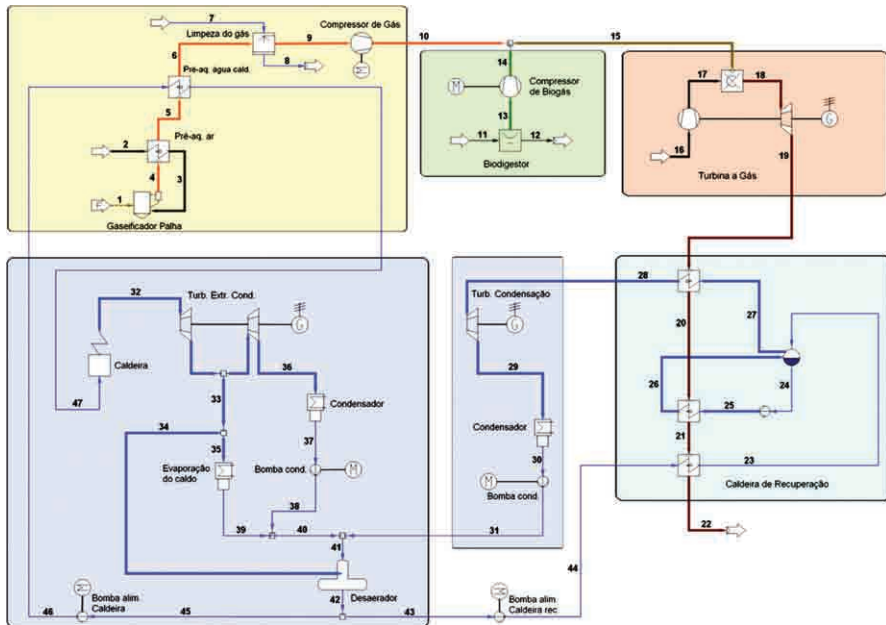


Figura 20.19 – Planta integrada para gaseificação da palha e da vinhaça numa usina idealizada (Caso 5)

O sistema para gaseificação da palha e da vinhaça é semelhante ao do Caso 4. A turbina a gás considerada é da Hitachi, modelo PG7121 (EA), com razão de pressão de 12,6 e potência nominal de 85,4 MW. Nesse caso, foi considerado um aumento na pressão do vapor produzido pelas caldeiras convencional e de recuperação, de forma que o vapor é gerado a 86 bar e 520°C. A planta de vapor da usina conta com caldeira que gera 320 t/h de vapor e turbina de extração-condensação de múltiplos estágios, além da turbina de condensação para aproveitar o vapor gerado pela caldeira de recuperação.

Vale destacar ainda que nesse caso considera-se uma redução no consumo de vapor para o processo, de forma que esse consome uma vazão de 231 t/h de vapor, o que corresponde a 403 kg de vapor por tonelada de cana moída. O pré-aquecimento da água de alimentação da caldeira, mediante a redução da temperatura do gás da palha, permite um aumento na geração de vapor da caldeira de 320 t/h para 340 t/h, considerando que a eficiência da caldeira se mantenha estável.

Na Tabela 20.18 são apresentados alguns dados hipotéticos da safra dessa usina idealizada.

Tabela 20.18 – Dados de safra da usina idealizada

Parâmetros	Valores	Unidades
Cana moída total	3.000.000	t
Dias de safra	240	dias
Horas efetivas de moagem	5.241	h
Moagem horária	572,3	t/h
Relação bagaço-vapor	0,44	kg/kg
Vazão de bagaço produzido	163,0	t/h
Vazão de bagaço na caldeira	150,0	t/h
Vazão de bagaço excedente	13,0	t/h
Vazão de palha gaseificada	60,0	t/h
Vazão de vinhaça biodigerida	360,0	m <sup>3</sup> /h
Vazão de vapor na caldeira	340,0	t/h
Consumo de vapor no processo	231,0	t/h

## Resultados

### Considerações e cálculos preliminares

A seguir, são apresentados alguns cálculos preliminares e considerações necessárias para as simulações.

A solução do sistema de equações resultante da análise termodinâmica de cada um dos casos é obtida pelo emprego do *software* IPSEpro® (SIMTECH IPSEPRO, 2003), sendo que maiores informações sobre o mesmo podem ser obtidas em [www.simtechnology.com](http://www.simtechnology.com).

Foram consideradas eficiências isentrópicas de 80% para os compressores e 75% para as bombas. As eficiências de conversão elétrica e mecânica foram estimadas em 98%. O PCI da palha e do bagaço são, respectivamente, 13.151 e 7.736 kJ/kg, de acordo com Hassuani et al. (2005). A exergia dos combustíveis foi calculada de acordo com a metodologia apresentada anteriormente. Nos casos com biodigestão da vinhaça, os cálculos foram feitos com base no PCI do biogás gerado, que é 26.022 kJ/kg, o qual foi calculado pelo *software* IPSEpro® com base na sua composição.

A fim de verificar o desempenho das turbinas a gás selecionadas quando trabalham com gás de baixo poder calorífico, foram realizadas simulações dessas com esse tipo de gás. Foi verificado que a temperatura da combustão sempre ficou menor que a temperatura de chama para a simulação com gás natural, assim como houve uma menor temperatura dos gases de exaustão, diminuindo a eficiência do ciclo.

Em relação às vazões no sistema, foi observado que, com a utilização de gás proveniente da biodigestão da vinhaça, a vazão desse combustível era cerca de duas vezes maior que a vazão de gás natural, enquanto, no caso da gaseificação da palha, a vazão desse combustível era cerca de nove vezes maior. A vazão de ar para a combustão também foi menor nas situações com gaseificação se comparado com o uso de gás natural. Entretanto, essa redução da vazão de ar deve ser controlada, pois vazões de ar muito inferiores podem levar o compressor ao fenômeno de “surge”, o que poderia acarretar em fluxo reverso no compressor.

Em todas as situações analisadas, comparando-se com o uso de gás natural, houve redução na potência total do conjunto e na eficiência das turbinas. A redução na eficiência ficou entre 5,6%, quando da utilização do biogás da vinhaça, e 10,9%, quando da utilização da mistura de gases da vinhaça e da palha, mostrando que a palha contribui mais para essa redução.

Na simulação com gás de biomassa, procurou-se trabalhar com uma vazão de gases de exaustão semelhante à vazão de gases da turbina a gás operando com gás natural. Além disso, os níveis de pressão no ciclo não foram alterados. Como essa análise visa apenas à comparação entre as duas condições de operação das turbinas, com esses parâmetros fixados (vazão e pressão), os resultados da simulação com gás de biomassa aqui apresentados diferem daqueles encontrados na simulação dos casos estudados, uma vez que as turbinas a gás utilizadas nas plantas de cogeração operam com vazões de combustível dadas pela capacidade de produção das plantas, de forma que a vazão de gases sempre difere da vazão nas condições padrão.

Os custos dos equipamentos das configurações estudadas foram estimados a partir de informações disponíveis na literatura (*Gas Turbine World Handbook*, 2001-2002; Garagatti Arriola, 2000). Os custos referentes aos sistemas de biodigestão da vinhaça foram estimados de acordo com Salomon (2007), e os custos específicos dos equipamentos dos sistemas BIG-GTCC foram estimados de acordo com Larson et al. (2001), além de informações do Instituto de Economia Agrícola (Torquato; Fronzaglia, 2005), de forma que foi considerado um custo específico para implantação do sistema BIG-GTCC de cerca de R\$ 2.500,00/kW (aproximadamente US\$ 1.400,00/kW). O custo anual dos equipamentos, com amortização, foi calculado levando-se em conta um período de amortização de vinte anos. A taxa de juros considerada foi de 12%, condizente com o cenário econômico brasileiro. Foi considerado ainda um percentual de custo anual fixo associada à operação

e manutenção de 9%, e um percentual de custo anual variável de operação e manutenção de 1%, com um fator de carga de 0,75.

Nas Tabelas 20.19 a 20.23 são apresentados os custos dos equipamentos (expressos em reais, mas atualizados com relação a data da fonte, com base na variação do dólar), os custos anuais amortizados e as taxas de custos de cada equipamento utilizado.

Tabela 20.19 – Custo estimado dos equipamentos e custos com amortização – Caso 1

Equipamento	Custo (R\$)	$\dot{Z}_k^a$ (R\$/ano)	$\dot{Z}^a$ (R\$/s)
Caldeira	28.000.000,00	6.478.605,84	0,277718
Turbina a vapor extração-condensação	17.000.000,00	3.933.439,26	0,168615
Turbina a vapor contrapressão	3.000.000,00	694.136,34	0,029756
Condensador	800.000,00	185.103,02	0,007935
Bomba de condensado	100.000,00	23.137,88	0,000992
Dessuperaquecedor	150.000,00	34.706,82	0,001488
Evaporação do caldo	1.000.000,00	231.378,78	0,009919
Mistura dos condensados	200.000,00	46.275,76	0,001984
Desaerador	2.000.000,00	462.757,56	0,019837
Bomba da caldeira	1.800.000,00	416.481,80	0,017853

Tabela 20.20 – Custo estimado dos equipamentos e custos com amortização – Caso 2

Equipamento	Custo (R\$)	$\dot{Z}_k^a$ (R\$/ano)	$\dot{Z}^a$ (R\$/s)
Biodigestor	3.300.000,00	763.549,97	0,032731
Compressor	1.200.000,00	277.654,54	0,011902
Turbina a gás	3.250.000,00	751.981,04	0,032235
Caldeira de recuperação	3.510.000,00	812.139,52	0,034814
Turbina a vapor de condensação	950.000,00	219.809,84	0,009423
Condensador da turb. condensação	200.000,00	46.275,76	0,001984
Bomba de condensado turb. cond.	50.000,00	11.568,94	0,000496
Caldeira	28.000.000,00	6.478.605,84	0,277718
Turbina a vapor extração-condensação	17.000.000,00	3.933.439,26	0,168615
Turbina a vapor contrapressão	3.000.000,00	694.136,34	0,029756
Condensador	800.000,00	185.103,02	0,007935
Bomba de condensado	100.000,00	23.137,88	0,000992
Dessuperaquecedor	150.000,00	34.706,82	0,001488
Evaporação do caldo	1.000.000,00	231.378,78	0,009919
Mistura de condensados	200.000,00	46.275,76	0,001984
Desaerador	2.000.000,00	462.757,56	0,019837
Bomba da caldeira	1.800.000,00	416.481,80	0,017853
Bomba HRSG	150.000,00	34.706,82	0,001488



Tabela 20.21 – Custo estimado dos equipamentos e custos com amortização – Caso 3

Equipamento	Custo (R\$)	$\dot{Z}_k^a$ (R\$/ano)	$\dot{Z}^a$ (R\$/s)
Caldeira	28.000.000,00	6.478.605,84	0,277718
Turbina a vapor extração-condensação	17.000.000,00	3.933.439,26	0,168615
Turbina a vapor contrapressão	3.000.000,00	694.136,34	0,029756
Condensador	800.000,00	185.103,02	0,007935
Bomba de condensado	100.000,00	23.137,88	0,000992
Dessuperaquecedor	150.000,00	34.706,82	0,001488
Evaporação do caldo	1.000.000,00	231.378,78	0,009919
Mistura de condensados	200.000,00	46.275,76	0,001984
Desaerador	2.000.000,00	462.757,56	0,019837
Bomba da caldeira	1.800.000,00	416.481,80	0,017853
Gaseificador	39.000.000,00	9.023.772,42	0,386822
Resfriamento de gás	2.800.000,00	647.860,58	0,027772
Limpeza do gás	5.600.000,00	1.295.721,17	0,055544
Compressor de gás	6.700.000,00	1.550.237,83	0,066454
Turbina a gás	19.800.000,00	4.581.299,84	0,196386
Caldeira de recuperação	21.400.000,00	4.951.505,89	0,212256
Turbina a vapor de condensação	5.000.000,00	1.156.893,90	0,049593
Condensador da turb. condensação	1.000.000,00	231.378,78	0,009919
Bomba Cond. turb. condensação	100.000,00	23.137,88	0,000992
Bomba HRSG	700.000,00	161.965,15	0,006943

Tabela 20.22 – Custo estimado dos equipamentos e custos com amortização – Caso 4

Equipamento	Custo (R\$)	$\dot{Z}_k^a$ (R\$/ano)	$\dot{Z}^a$ (R\$/s)
Gaseificador	39.060.000,00	9.037.655,15	0,387417
Resfriamento de gás	2.790.000,00	645.546,80	0,027673
Limpeza do gás	5.580.000,00	1.291.093,59	0,055345
Biodigestor	3.300.000,00	763.549,97	0,032731
Compressor	6.700.000,00	1.550.237,83	0,066454
Turbina a gás	24.750.000,00	5.726.624,81	0,245483
Caldeira de recuperação	26.800.000,00	6.200.951,31	0,265816
Turbina a vapor de condensação	4.900.000,00	1.133.756,02	0,048601
Condensador da turb. condensação	1.000.000,00	231.378,78	0,009919
Bomba de condensado turb. cond.	100.000,00	23.137,88	0,000992
Caldeira	28.000.000,00	6.478.605,84	0,277718
Turbina a vapor extração-condensação	17.000.000,00	3.933.439,26	0,168615
Turbina a vapor contrapressão	3.000.000,00	694.136,34	0,029756

Continua

Tabela 20.22 – *Continuação*

Equipamento	Custo (R\$)	$\dot{Z}_k^a$ (R\$/ano)	$\dot{Z}^a$ (R\$/s)
Condensador	800.000,00	185.103,02	0,007935
Bomba de condensado	100.000,00	23.137,88	0,000992
Dessuperaquecedor	150.000,00	34.706,82	0,001488
Evaporação do caldo	1.000.000,00	231.378,78	0,009919
Mistura de condensados	200.000,00	46.275,76	0,001984
Desaerador	2.000.000,00	462.757,56	0,019837
Bomba da caldeira	1.800.000,00	416.481,80	0,017853
Bomba HRSG	800.000,00	185.103,02	0,007935

Tabela 20.23 – Custo estimado dos equipamentos e custos com amortização – Caso 5

Equipamento	Custo (R\$)	$\dot{Z}_k^a$ (R\$/ano)	$\dot{Z}^a$ (R\$/s)
Gaseificador	78.000.000,00	18.047.544,84	0,773643
Resfriamento de gás	5.600.000,00	1.295.721,17	0,055544
Limpeza do gás	11.200.000,00	2.591.442,34	0,111087
Compressor de gás de biomassa	13.400.000,00	3.100.475,65	0,132908
Biodigestor	6.500.000,00	1.503.962,07	0,064470
Compressor de biogás	2.100.000,00	485.895,44	0,020829
Turbina a gás	36.200.000,00	8.375.911,84	0,359050
Caldeira de recuperação	40.000.000,00	9.255.151,20	0,396740
Turbina a vapor de condensação	13.500.000,00	3.123.613,53	0,133900
Condensador da turb. condensação	2.800.000,00	647.860,58	0,027772
Bomba de condensado turb. condens.	300.000,00	69.413,63	0,002976
Caldeira	45.000.000,00	10.412.045,10	0,446333
Turbina a vapor extração-condensação	34.000.000,00	7.866.878,52	0,337229
Condensador	1.600.000,00	370.206,05	0,015870
Bomba de condensado	200.000,00	46.275,76	0,001984
Evaporação do caldo	2.000.000,00	462.757,56	0,019837
Mistura de condensados	350.000,00	80.982,57	0,003471
Desaerador	4.000.000,00	925.515,12	0,039674
Bomba da caldeira	3.500.000,00	809.825,73	0,034715
Bomba HRSG	1.700.000,00	393.343,93	0,016861

O custo do bagaço foi considerado igual a R\$ 15,00/t, enquanto o custo da vinhaça foi admitido ser R\$ 5,00/m<sup>3</sup>. Foi considerado também que o custo da palha da cana para utilização na usina é de R\$ 32,00/t, custo esse que se deve ao seu transporte até a indústria, o custo de oportunidade da palha no campo e seu custo de processamento (MME, 2007).

A resolução do sistema de equações resultante da análise termoeconômica foi efetuada utilizando-se o programa EES® (*Engineering Equation Solver*), desenvolvido por Klein e Alvarado (1995), que possibilita a realização de cálculos de maneira simples e eficiente.

### Resultados termodinâmicos

Nas Tabelas 20.24 a 20.28 são apresentadas: a potência eletromecânica, a potência térmica, as irreversibilidades geradas e as eficiências pela primeira e pela segunda leis da termodinâmica para os equipamentos das plantas analisadas.

Tabela 20.24 – Potência eletromecânica, térmica, irreversibilidades e eficiências para os equipamentos da planta do Caso 1

Equipamento	$\dot{W}$ (kW)	$\dot{Q}$ (kW)	$i$ (kW)	$\eta_I$ (%)	$\eta_{II}$ (%)
Caldeira	–	167.613,3	36.870,08	78,0	27,5
Turb. a vapor extr.-condensação	27.147,52	–	3.594,03	85,8	88,7
Turb. a vapor de contrapressão	6.527,54	–	944,91	84,0	84,3
Bomba da caldeira	502,16	–	89,66	75,0	78,2
Bomba de condensado	2,39	–	0,45	75,0	77,2
Processo	–	79.791,3	40.347,66	–	–
Condensador	–	16.372,9	1.477,41	–	–

Tabela 20.25 – Potência eletromecânica, térmica, irreversibilidades e eficiências para os equipamentos da planta do Caso 2

Equipamento	$\dot{W}$ (kW)	$\dot{Q}$ (kW)	$i$ (kW)	$\eta_I$ (%)	$\eta_{II}$ (%)
Compressor de biogás	372,79	–	38,22	80,0	85,8
Turbina a gás	5.511,96	–	7.230,80	30,5	39,2
Turb. a vapor de condensação	2.795,77	–	518,05	84,0	81,5
Turb. a vapor de contrapressão	7.460,06	–	1.079,90	84,0	84,3
Turb. a vapor de extr.-condensação	25.930,35	–	3.425,42	85,8	88,7
Bomba da caldeira	502,16	–	89,66	75,0	78,2
Bomba da caldeira de recuperação	24,85	–	4,44	75,0	78,2
Bomba de cond. turb. extr.-condens.	2,47	–	0,64	75,0	69,9
Bomba de cond. turb. condensação	0,94	–	0,17	75,0	77,8
Processo	–	80.251,9	40.120,37	–	–
Condensador turb. extr.-condens.	–	15.179,3	1.368,69	–	–
Condensador turb. condensação	–	6.561,4	859,5	–	–
Caldeira	–	167.613,3	36.870,08	78,0	27,5
Caldeira de recuperação	–	9.050,5	632,21	93,0	89,4

Tabela 20.26 – Potência eletromecânica, térmica, irreversibilidades e eficiências para os equipamentos da planta do Caso 3

Equipamento	$\dot{W}$ (kW)	$\dot{Q}$ (kW)	$i$ (kW)	$\eta_i$ (%)	$\eta_{II}$ (%)
Compressor de gás	10.180,09	–	872,54	80,0	87,5
Turbina a gás	31.046,12	–	33.823,66	33,8	59,1
Turb. a vapor de condensação	14.317,16	–	2.652,95	84,0	81,5
Turb. a vapor de contrapressão	9.325,09	–	1.349,87	84,0	84,3
Turb. a vapor de extr.-condensação	26.262,63	–	3.488,33	85,7	88,7
Bomba da caldeira	534,95	–	95,51	75,0	78,2
Bomba da caldeira de recuperação	127,26	–	22,74	75,0	78,2
Bomba de cond. turb. extr.-condens.	2,74	–	0,72	75,0	69,9
Bomba de cond. turb. condensação	4,80	–	0,88	75,0	77,8
Processo	–	80.251,9	40.120,37	–	–
Condensador turb. extr.-condens.	–	16.850,9	1.519,41	–	–
Condensador turb. condensação	–	33.601,2	4.401,55	–	–
Caldeira	–	167.613,3	36.106,25	78,5	28,2
Caldeira de recuperação	–	48.009,2	4.899,23	89,8	75,6

Tabela 20.27 – Potência eletromecânica, térmica, irreversibilidades e eficiências para os equipamentos da planta do Caso 4

Equipamento	$\dot{W}$ (kW)	$\dot{Q}$ (kW)	$i$ (kW)	$\eta_i$ (%)	$\eta_{II}$ (%)
Compressor de gás	11.563,52	–	958,44	80,0	87,8
Turbina a gás	40.838,05	–	40.309,11	36,2	63,5
Turb. a vapor de condensação	14.128,72	–	2.618,04	84,0	81,5
Turb. a vapor de contrapressão	9.325,09	–	1.349,87	84,0	84,3
Turb. a vapor de extr.-condensação	26.274,06	–	3.490,49	85,7	88,7
Bomba da caldeira	534,95	–	95,51	75,0	78,2
Bomba da caldeira de recuperação	108,59	–	19,41	75,0	78,2
Bomba de cond. turb. extr.-condens.	2,75	–	0,72	75,0	69,9
Bomba de cond. turb. condensação	4,74	–	0,87	75,0	77,8
Processo	–	80.251,9	42.088,47	–	–
Condensador turb. extr.-condens.	–	16.908,4	1.524,60	–	–
Condensador turb. condensação	–	33.158,9	4.343,62	–	–
Caldeira	–	167.613,3	36.106,25	78,5	28,2
Caldeira de recuperação	–	56.684,4	14.125,55	75,1	64,8

Tabela 20.28 – Potência eletromecânica, térmica, irreversibilidades e eficiências para os equipamentos da planta do Caso 5

Equipamento	$\dot{W}$ (kW)	$\dot{Q}$ (kW)	$i$ (kW)	$\eta_i$ (%)	$\eta_{II}$ (%)
Compressor de gás da palha	20.194,6	–	1.732,0	80,0	91,1
Compressor biogás da vinhaça	736,6	–	78,2	80,0	88,9
Turbina a gás	72.349,5	–	80.810,7	32,2	60,1
Turbina a vapor de condensação	39.682,1	–	7.353,4	84,0	81,5
Turb. a vapor de extr.-condensação	75.799,1	–	10.105,9	85,8	88,6
Bomba da caldeira	1.313,1	–	233,6	75,0	78,3
Bomba da caldeira de recuperação	538,4	–	95,5	75,0	78,3
Bomba de cond. turb. extr.-condens.	6,5	–	1,3	75,0	75,7
Bomba de cond. turb. condensação	12,4	–	2,8	75,0	73,4
Processo	–	142.042,9	73.458,96	–	–
Condensador turb. extr. condens.	–	43.008,2	3.877,86	–	–
Condensador turb. condensação	–	81.554,4	10.682,01	–	–
Caldeira	–	322.333,3	62.315,5	80,7	29,6
Caldeira de recuperação	–	119.656,7	10.463,5	91,3	83,9

As condições de operação dos gaseificadores de palha dos Casos 3, 4 e 5 não foram alteradas e, portanto, suas eficiências não apresentaram grandes flutuações, de forma que a eficiência a quente dos gaseificadores foi de 93,8%, enquanto a eficiência a frio ficou em 83,6%, calculadas com base no poder calorífico da palha com 15% de umidade em base úmida.

Na Tabela 20.29 são apresentados os resultados para os índices de desempenho das plantas, baseados na primeira lei da termodinâmica, e nos Gráficos 20.9 a 20.12 são apresentados graficamente os resultados para a eficiência global, eficiência de aproveitamento da biomassa, razão potência-calor e para a relação potência elétrica-cana moída, para os casos analisados.

Tabela 20.29 – Índices de desempenho das plantas analisadas

Índice	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
$\eta_{global}$ – Eficiência global da planta (%)	61,4	58,7	48,1	47,3	47,1
$\eta_{aprov, biom}$ – Eficiência aproveitamento da biomassa (%)	34,9	36,1	44,2	46,3	47,1
RPC – Razão Potência-Calor	0,290	0,359	0,662	0,740	0,915
$R_{bag, vapor}$ – Relação bagaço-vapor ( $kg_{bag}/kg_{vapor}$ )	0,488	0,488	0,470	0,459	0,441
$R_{vapor, cana}$ – Relação vapor-cana moída ( $kg_{vapor}/t_{cana}$ )	454	454	454	454	403
$R_{pot, cana}$ – Relação pot. elétrica-cana moída ( $kWh/t_{cana}$ )	81	101	186	207	227

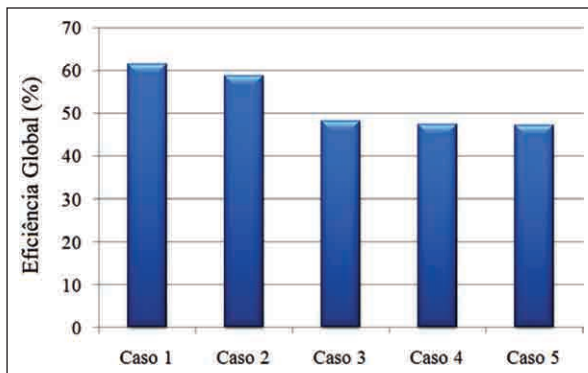


Gráfico 20.9 – Eficiência global para cada um dos casos considerados

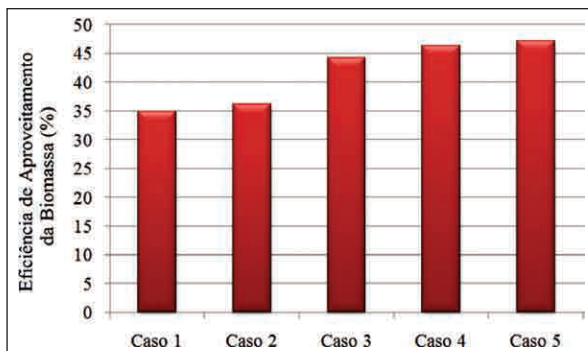


Gráfico 20.10 – Eficiência de aproveitamento da biomassa para cada um dos casos considerados

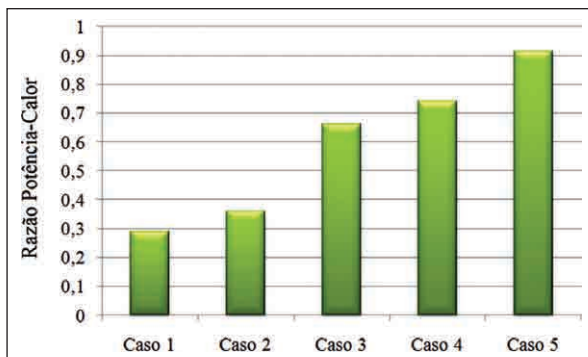


Gráfico 20.11 – Razão potência-calor para cada um dos casos considerados

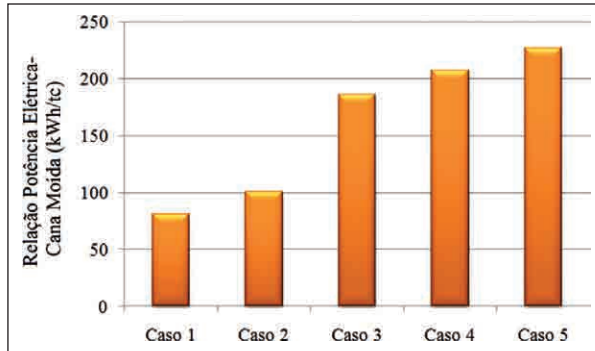


Gráfico 20.12 – Razão potência elétrica-cana moída para cada um dos casos considerados

De acordo com o Gráfico 20.9, verifica-se que a integração da gaseificação à planta da usina promove uma redução na eficiência global, uma vez que esse índice considera apenas a relação entre a energia útil e a energia efetivamente fornecida à planta, desconsiderando outras fontes de energia disponíveis na usina que poderiam ser utilizadas. Entretanto, as vantagens da gaseificação, sob a óptica da termodinâmica, podem ser vistas no Gráfico 20.10, pois a eficiência de aproveitamento da biomassa é superior à do Caso 1 em todos os outros casos. Esse aumento era esperado, uma vez que a gaseificação possibilita um aumento na geração de eletricidade em todos os casos, e, também, pelo fato de que a eficiência de aproveitamento da biomassa tem como base toda a biomassa disponível na usina, o que resulta em um melhor aproveitamento nos casos com gaseificação. Observa-se também um expressivo aumento na Razão Potência-Calor (RPC) e na relação potência elétrica-cana moída ( $R_{pot,cana}$ ) da usina, índice este que poderia atingir 227 kWh/tc com a gaseificação da palha e vinhaça em uma usina moderna idealizada.

### Resultados termoeconômicos

Na Tabela 20.30 são mostrados os resultados termoeconômicos para cada um dos casos estudados, obtidos com base na Teoria do Custo Exergético.

O custo médio da energia elétrica produzida é obtido a partir de uma média ponderada entre os custos de geração de cada um dos turbogeradores existentes, para as configurações que possuem mais de um turbogerador.

A Tabela 20.30 mostra que tanto a gaseificação da palha como a biodigestão da vinhaça promovem um aumento no custo médio de geração de eletricidade da usina. Esse aumento ocorre pelo elevado custo de geração

Tabela 20.30 – Resultados termoeconômicos para cada caso estudado

Parâmetros	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
Custo de geração de eletricidade na turbina a gás (R\$/MWh)	–	284,90	93,91	100,10	110,10
Custo de geração de eletricidade da turbina a vapor de condensação (R\$/MWh)	–	204,70	151,70	179,40	145,40
Custo de geração de eletricidade da turbina a vapor de extração-condensação (R\$/MWh)	94,40	69,25	92,68	93,65	76,96
Custo de geração de eletricidade da turbina a vapor de contrapressão (R\$/MWh)	89,21	60,69	81,76	82,75	–
Custo médio de geração de eletricidade (R\$/MWh)	93,39	105,30	102,30	108,80	104,20
Custo do vapor de processo (R\$/t)	11,56	7,38	11,17	11,32	9,64

de eletricidade da turbina a gás e da turbina de condensação, e pode-se observar que os custos de geração das turbinas a vapor da planta convencional não se elevam, ficando menores que os custos do Caso 1 nos Casos 2 e 5, embora o custo do vapor de processo também tenha ficado bem menor nesses casos.

Os resultados apresentados na Tabela 20.30 foram obtidos considerando valores fixos para os custos dos insumos, ou seja, o custo de bagaço de R\$ 15,00/t, o custo da palha de R\$ 32,00/t e o custo da vinhaça de R\$ 5,00/m<sup>3</sup>. A fim de se realizar uma avaliação mais completa, serão apresentadas a seguir análises de sensibilidade do custo médio de geração em função dos custos dos insumos.

O Gráfico 20.13 apresenta a curva de sensibilidade do custo médio de geração de eletricidade do Caso 1 em razão da variação do custo do bagaço entre R\$ 0,00/t e R\$ 20,00/t.

De acordo com esse gráfico, o custo de geração de eletricidade para o Caso 1 se mostra bastante sensível em relação ao custo do bagaço, pois a variação do custo do bagaço de R\$ 0,00/t para R\$ 20,00/t promove uma elevação no custo da eletricidade de R\$ 47,00/MWh.

O Gráfico 20.14 apresenta a curva de sensibilidade do custo médio de geração de eletricidade para o Caso 2, em razão do custo do bagaço e para o custo da vinhaça variando entre R\$ 0,00/m<sup>3</sup> e R\$ 10,00/m<sup>3</sup>.

O Gráfico 20.15 apresenta a curva de sensibilidade do custo médio de geração para Caso 3, em razão do custo do bagaço e variando-se o custo da palha entre R\$ 10,00/t e R\$ 40,00/t.



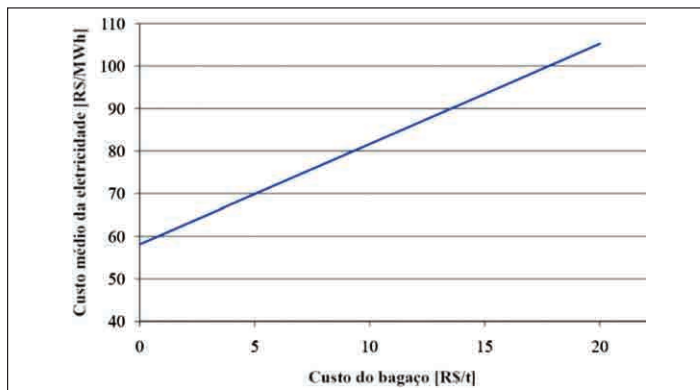


Gráfico 20.13 – Curva de sensibilidade do custo de geração para o Caso 1

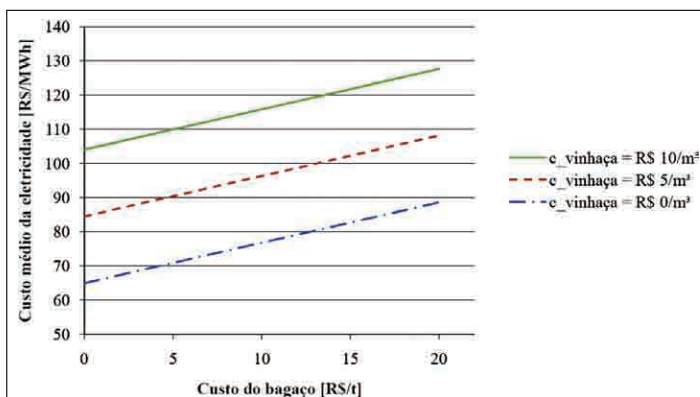


Gráfico 20.14 – Curvas de sensibilidade do custo de geração para o Caso 2

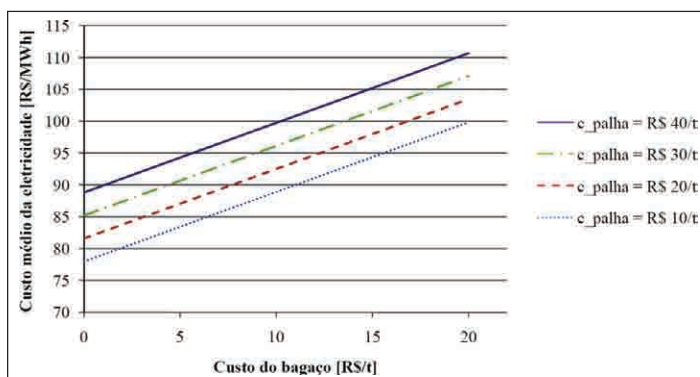


Gráfico 20.15 – Curvas de sensibilidade do custo de geração para o Caso 3

Observando-se os Gráficos 20.14 e 20.15, nota-se que o custo de geração da eletricidade se mostra muito mais sensível em relação ao custo da vinhaça do que em relação ao custo da palha, pois a variação do custo da vinhaça entre R\$ 0,00/m<sup>3</sup> e R\$ 10,00/m<sup>3</sup> resulta em uma diferença de custo de R\$ 39,00/MWh, enquanto a variação do custo da palha entre R\$ 10,00/t e R\$ 40,00/t resulta em uma diferença de apenas R\$ 11,00/MWh.

Nos Gráficos 20.16 a 20.18 são apresentadas as curvas de sensibilidade do custo médio de geração de eletricidade para o Caso 4, em razão dos custos do bagaço e da palha, e para custos da vinhaça de R\$ 0,00/m<sup>3</sup>, R\$ 5,00/m<sup>3</sup> e R\$ 10,00/m<sup>3</sup>, respectivamente. Os gráficos mostram que, de forma similar aos Casos 2 e 3, o custo de geração de eletricidade se mostrou muito mais sensível em relação ao custo da vinhaça do que em relação ao custo da palha, uma vez que, para uma variação do custo da palha de R\$ 10,00/t para R\$ 40,00/t, o custo médio de geração de eletricidade sofreu um aumento de apenas R\$ 5,00/MWh, enquanto que para um aumento da vinhaça de R\$ 0,00/m<sup>3</sup> para R\$ 10,00/m<sup>3</sup> o aumento foi de aproximadamente R\$ 18,00/MWh.

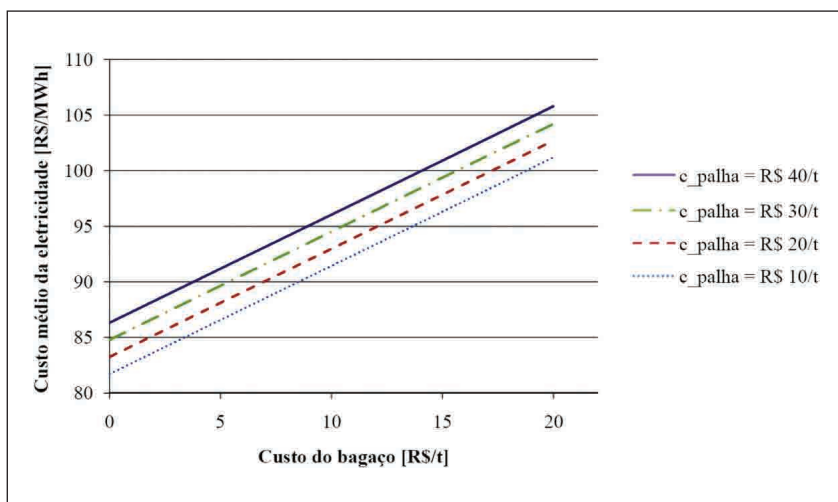


Gráfico 20.16 – Curvas de sensibilidade do custo de geração para o Caso 4, para a vinhaça custando R\$ 0,00/m<sup>3</sup>

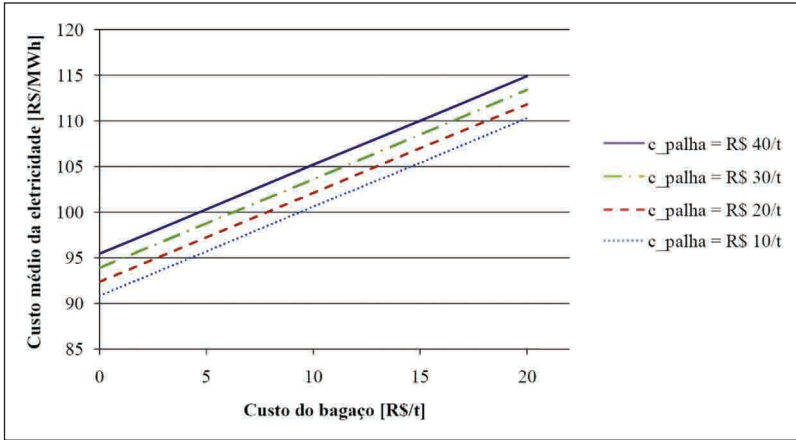


Gráfico 20.17 – Curvas de sensibilidade do custo de geração para o Caso 4, para a vinhaça custando R\$ 5,00/m<sup>3</sup>

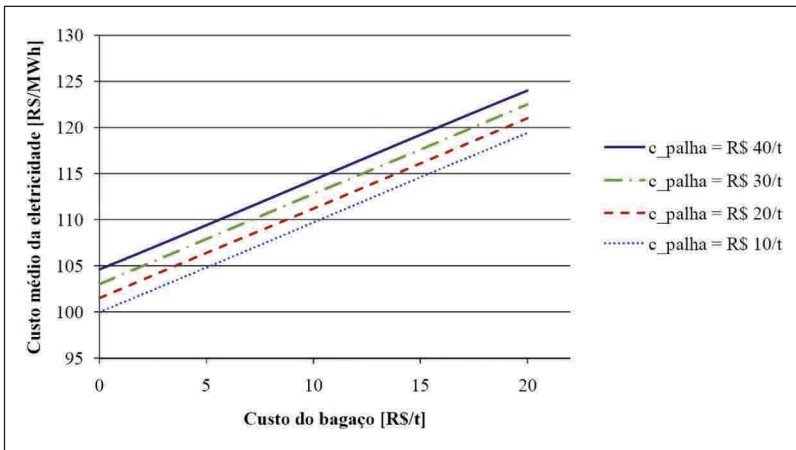


Gráfico 20.18 – Curvas de sensibilidade do custo de geração para o Caso 4, para a vinhaça custando R\$ 10,00/m<sup>3</sup>

Nos Gráficos 20.19 a 20.21 são apresentadas as curvas de sensibilidade do custo médio de geração de eletricidade para o Caso 5, em razão dos custos do bagaço e da palha, e para custos da vinhaça de R\$ 0,00/m<sup>3</sup>, R\$ 5,00/m<sup>3</sup> e R\$ 10,00/m<sup>3</sup>, respectivamente.

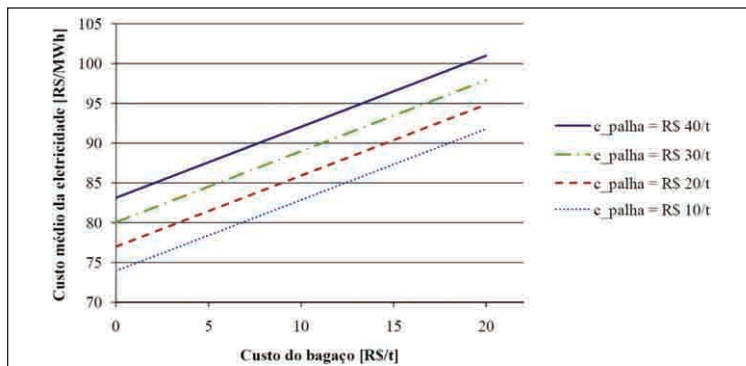


Gráfico 20.19 – Curvas de sensibilidade do custo de geração para o Caso 5, para a vinhaça custando R\$ 0,00/m<sup>3</sup>

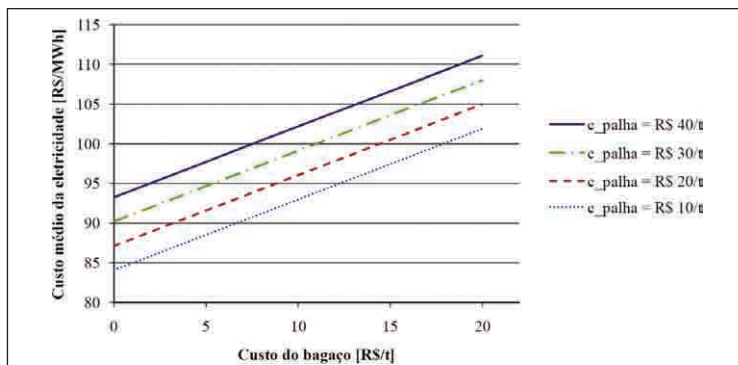


Gráfico 20.20 – Curvas de sensibilidade do custo de geração para o Caso 5, para a vinhaça custando R\$ 5,00/m<sup>3</sup>

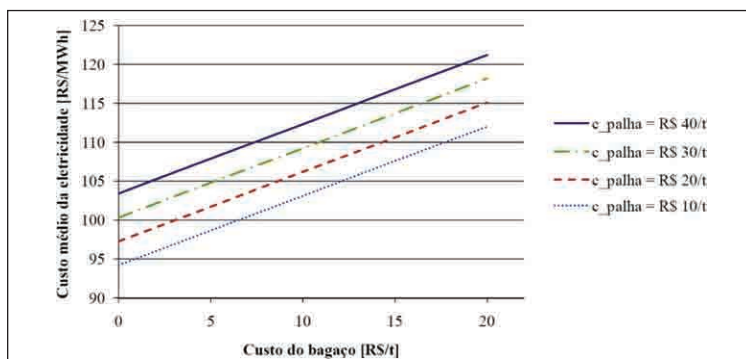


Gráfico 20.21 – Curvas de sensibilidade do custo de geração para o Caso 5, para a vinhaça custando R\$ 10,00/m<sup>3</sup>

Os Gráficos 20.19 a 20.21 mostram que, analogamente ao Caso 4, o custo médio de geração de eletricidade do Caso 5 é muito mais sensível ao custo da vinhaça do que ao custo da palha, pois a variação do custo da palha de R\$ 10,00/t para R\$ 40,00/t implica uma variação do custo médio de geração de R\$ 9,00/MWh, enquanto que a variação do custo da vinhaça de R\$ 0,00/m<sup>3</sup> para R\$ 10,00/m<sup>3</sup> resulta em um aumento de R\$ 20,00/MWh no custo de geração de eletricidade.

Em todos os casos estudados que envolvem gaseificação, a variação do custo do bagaço apresentou influência semelhante sobre o custo de geração de eletricidade, uma vez que o aumento de R\$ 20,00/t no custo do bagaço resultou em um aumento de aproximadamente R\$ 20,00/MWh, em média, ou seja, para um aumento de R\$ 1,00/t de bagaço haveria um aumento de aproximadamente R\$ 1,00/MWh no custo de geração.

### Resultados econômicos

Com o auxílio da análise econômica é possível observar o comportamento do fluxo de caixa ao longo da vida útil da planta, além de verificar a viabilidade financeira dos investimentos.

Na Tabela 20.31 são apresentados alguns resultados globais para os casos de estudo, como potência produzida, o consumo de eletricidade da usina, potência excedente disponível para comercialização, além do custo de geração da eletricidade e o investimento total no sistema de cogeração analisado.

Tabela 20.31 – Resultados globais de para os casos estudados

Resultados	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
Quantidade de eletricidade produzida (MW)	33,2	40,8	70,1	78,3	165,0
Quantidade de eletricidade consumida* (MW)	10,0	12,0	17,0	19,0	35,0
Quantidade de eletricidade excedente (MW)	23,2	28,8	53,1	59,3	130,0
Custo de geração de eletricidade (R\$/MWh)	93,39	105,30	102,30	108,80	104,20
Investimento total (milhões de R\$)	54,05	66,66	156,15	169,83	336,20
Custo por unidade de potência instalada (R\$/kW)	1.628	1.634	2.228	2.169	2.038

\*Valor estimado com base em usinas do setor

Para cada caso considerado, as análises foram feitas considerando quatro valores de venda da eletricidade, com preços que variam de R\$ 150,00/MWh até R\$ 180,00/MWh, permitindo, assim, avaliar o desempenho econômico do sistema para diversas opções de contratos de venda da eletricidade.

As Tabelas 20.32 a 20.36 apresentam os resultados para o Valor Presente Líquido (VPL), a Taxa Interna de Retorno do investimento (TIR) e o Tempo de Retorno do Investimento (TRI), em anos, para cada um dos casos estudados. Os Gráficos 20.22 a 20.26 apresentam o desempenho do fluxo de caixa dos casos estudados, para diferentes valores de venda da eletricidade, considerando um período de implantação do sistema de dois anos, tempo no qual ocorrem os desembolsos. A intersecção das curvas com o eixo horizontal representa o tempo de retorno do investimento, ou seja, o tempo a partir do qual o fluxo de caixa passa a ser positivo.

Tabela 20.32 – Resultados econômicos para o Caso 1, em razão do preço de venda da eletricidade

Preço de venda (R\$/MWh)	VPL (R\$)	TIR (%)	TRI (anos)
150,00	9.436.655,42	14,7	13,0
160,00	20.651.397,59	17,8	9,5
170,00	31.866.139,75	20,8	7,5
180,00	43.080.881,92	23,7	6,5

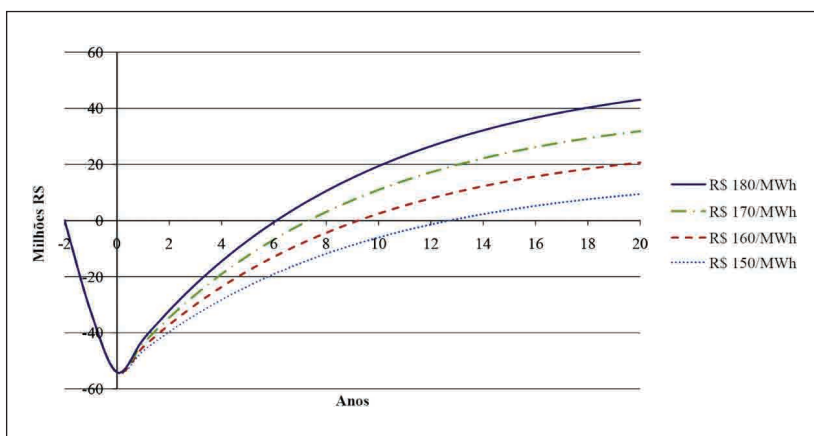


Gráfico 20.22 – Fluxo de caixa ao longo da vida útil da planta do Caso 1

Tabela 20.33 – Resultados econômicos para o Caso 2, em razão do preço de venda da eletricidade

Preço de venda (R\$/MWh)	VPL (R\$)	TIR (%)	TRI (anos)
150,00	-4.362.189,54	10,9	–
160,00	9.574.680,81	14,2	14,0
170,00	23.511.551,16	17,4	9,5
180,00	37.448.421,51	20,4	7,5

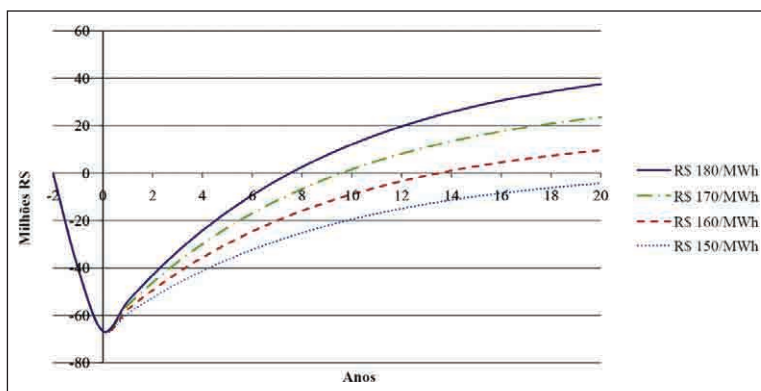


Gráfico 20.23 – Fluxo de caixa ao longo da vida útil da planta do Caso 2

Tabela 20.34 – Resultados econômicos para o Caso 3, em razão do preço de venda da eletricidade

Preço de venda (R\$/MWh)	VPL (R\$)	TIR (%)	TRI (anos)
150,00	-33.551.730,00	8,4	–
160,00	-7.849.787,00	11,2	–
170,00	17.852.155,00	13,8	14,5
180,00	43.554.098,00	16,3	11,0

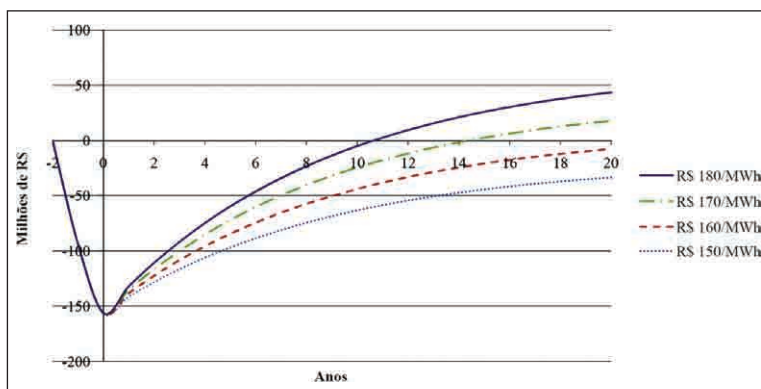


Gráfico 20.24 – Fluxo de caixa ao longo da vida útil da planta do Caso 3

Tabela 20.35 – Resultados econômicos para o Caso 4, em razão do preço de venda da eletricidade

Preço de venda (R\$/MWh)	VPL (R\$)	TIR (%)	TRI (anos)
150,00	-51.474.480,39	6,8	–
160,00	-22.747.412,53	9,8	–
170,00	5.979.655,34	12,6	18,0
180,00	34.706.723,21	15,2	12,0

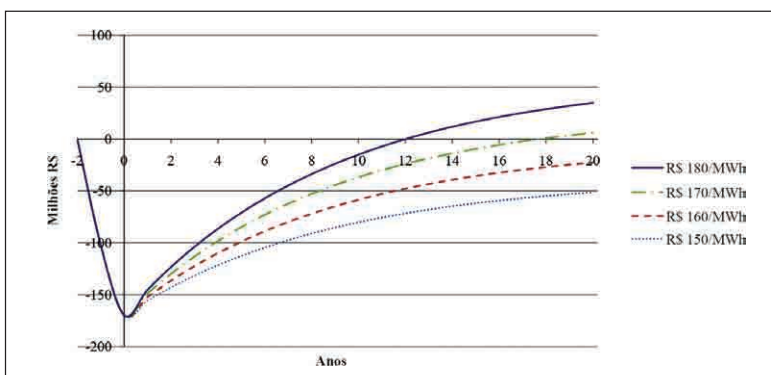


Gráfico 20.25 – Fluxo de caixa ao longo da vida útil da planta do Caso 4

Tabela 20.36 – Resultados econômicos para o Caso 5, em razão do preço de venda da eletricidade

Preço de venda (R\$/MWh)	VPL (R\$)	TIR (%)	TRI (anos)
150,00	-47.948.019,30	9,7	–
160,00	14.989.094,39	12,7	17,5
170,00	77.926.208,08	15,6	11,5
180,00	140.863.321,77	18,3	9,0

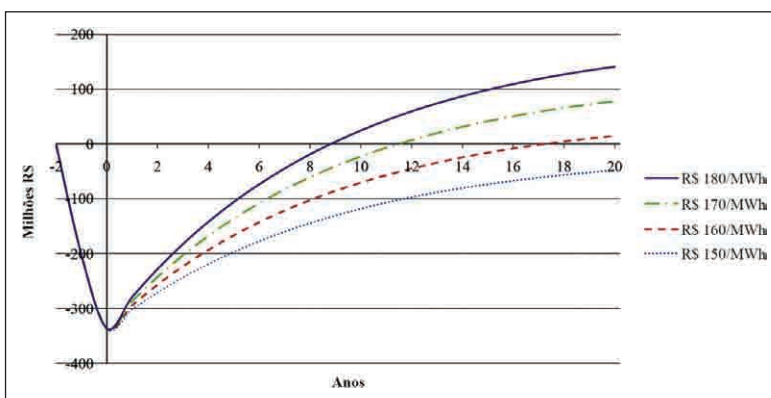


Gráfico 20.26 – Fluxo de caixa ao longo da vida útil da planta do Caso 5



Observando-se os Gráficos 20.22 a 20.26 e as Tabelas 20.31 a 20.36, pode-se observar que o Caso 1 se apresenta como o menos arriscado sob o ponto de vista econômico, uma vez que esse caso apresenta o menor tempo de retorno do investimento e os maiores valores para a Taxa Interna de Retorno (TIR). O tempo de retorno do investimento seria de 6,5 anos para um preço de venda da eletricidade de R\$ 180,00/MWh (valor reivindicado pelo setor), e o Valor Presente Líquido (VPL) para essa situação seria superior a 43 milhões de reais após um período de vinte anos.

Os casos que envolvem gaseificação da biomassa alcançaram valores para TIR menores que no Caso 1 e tempo de retorno do investimento superior. No caso da biodigestão da vinhaça (Caso 2), não haveria retorno do investimento para o preço de venda da eletricidade de R\$ 150,00/MWh (valor próximo aos valores atuais), e a TIR nessa situação não chegaria a 11%. Para a melhor situação analisada, ou seja, para um preço de venda da eletricidade de R\$ 180,00/MWh, o capital acumulado ao final de vinte anos seria inferior ao obtido pelo Caso 1.

Quando se considera a integração da gaseificação da palha integrada à planta da usina convencional (Casos 3 e 4) os resultados são ainda piores. Para esses casos, não haveria retorno de investimento para valores de venda da eletricidade inferiores a R\$ 170,00/MWh, e a máxima TIR obtida seria de 16,3% para o Caso 3, e 15,2% para o Caso 4.

Por sua vez, para o caso que considera uma usina idealizada com gaseificação da biomassa e equipamentos modernos e eficientes (Caso 5), de acordo com a Tabela 20.36 e com o Gráfico 20.21, já se verificaria retorno do investimento para preços de venda da eletricidade acima de R\$ 160,00/MWh. Pode ser observado ainda que, se a eletricidade fosse negociada a R\$ 180,00/MWh, a TIR obtida seria de 18,3%, o acúmulo de capital após vinte anos seria superior a 140 milhões de reais e o retorno do investimento aconteceria antes da metade da vida útil da planta, o que poderia tornar o projeto mais interessante.

## **Conclusões**

Nesta seção foi feita uma análise da proposta de integração da gaseificação da biomassa em uma usina sucroalcooleira existente e na concepção de uma planta de uma usina moderna que utiliza a gaseificação da biomassa. Foram avaliados cinco casos de estudo, que consideram desde a planta de

vapor de uma usina existente, à qual foram integrados sistemas para gaseificação da palha da cana e da vinhaça, até a concepção de uma planta de uma usina idealizada com gaseificação da palha e da vinhaça e que utiliza equipamentos modernos e eficientes, incluindo caldeira que gera vapor a altos níveis de pressão e temperatura e redução do consumo de vapor do processo.

Do ponto de vista termodinâmico, a gaseificação da palha integrada à planta da usina se mostrou uma tecnologia mais interessante, pois permite um aumento de 105 kWh/tc na geração de eletricidade. Em relação à biodigestão da vinhaça, há também um ganho na geração, mas em menor escala (20 kWh/tc).

De acordo com os resultados termoeconômicos, a gaseificação da vinhaça e da palha da cana implica uma elevação no custo da eletricidade gerada. Todavia, os resultados mostraram que o custo de geração da eletricidade é muito mais sensível em relação ao custo da vinhaça e ao custo do bagaço do que em relação ao custo da palha. Vale destacar que o custo atribuído à vinhaça diz respeito ao custo de oportunidade da mesma, uma vez que a aplicação da vinhaça nas lavouras de cana permitiria uma redução no uso de fertilizantes e poderia incrementar a produtividade. Além disso, o preço atribuído ao bagaço de cana também é discutível, e uma análise mais refinada envolvendo os processos de extração do caldo e produção do bagaço seria recomendada.

Em termos econômicos, o Caso 1 ainda se mostra como o caso menos ariscado, uma vez que apresenta o menor tempo de retorno do investimento e os maiores valores para a Taxa Interna de Retorno (TIR). Para todos os outros casos analisados, o tempo de retorno do investimento é mais longo, e para os atuais preços de venda da eletricidade (em torno de R\$ 150,00/MWh) não haveria retorno do investimento mesmo para um período de vinte anos. Entretanto, para os Casos 2 e 5, se a eletricidade fosse vendida a R\$ 180,00/MWh (que é um preço reivindicado pelo setor), seria possível obter retorno do investimento antes mesmo da metade da vida útil das plantas (dez anos). Isso poderia trazer maior atratividade para esses casos, especialmente para o Caso 5 (usina idealizada, com equipamentos modernos e eficientes), uma vez que esse caso apresenta uma grande geração de eletricidade (227 kWh/tc), além da maior eficiência de aproveitamento da biomassa (47,1%) e, para um preço de venda da eletricidade de R\$ 180,00/MWh, a TIR obtida chegaria a 18,3%.

É importante salientar que a tecnologia BIG-GTCC aplicada para gaseificação da palha da cana ainda está longe de se tornar comercial, e sua maturidade tecnológica não pode ser esperada nos próximos anos. Porém, seu desenvolvimento tem sido constante e crescente, de modo que, em longo prazo, essa tecnologia poderá se tornar uma alternativa interessante para o setor e contribuir no sentido de se evitar uma eventual crise de abastecimento de eletricidade.

Por fim, a realização de um estudo mais amplo, envolvendo todo o sistema de extração do caldo e produção de bagaço, além dos processos de fabricação do álcool e do açúcar, permitiria uma melhor determinação dos custos dos insumos utilizados e mostraria o impacto das novas tecnologias no sistema como um todo.

## Considerações finais

Em relação ao que foi exposto neste capítulo, ficaram claros a importância e o potencial do setor sucroalcooleiro para produção de eletricidade para comercialização, por meio do processo de cogeração, mediante novos empreendimentos e/ou ampliação/repotencialização de usinas já existentes, com a utilização de novos equipamentos e tecnologias que permitam um melhor aproveitamento energético e, em especial, em áreas de expansão da chamada “agricultura da energia”, estabelecidas no Plano Nacional de Agroenergia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que incluem principalmente a região oeste paulista e os Estados de Mato Grosso do Sul e Goiás.

Vale destacar que em estudos futuros, além de análises termodinâmica, termoeconômica e econômica, serão incorporadas análises de impacto ambiental e sustentabilidade.

## Referências bibliográficas

BARREDA DEL CAMPO, E. R. et al. Análises energética e exergética do sistema de cogeração da Usina Vale do Rosário. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS TÉRMICAS, 7, 1998, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro, 1998. v.1. p.307-312.

- BEJAN, A. et al. *Thermal design & optimization*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996. 542p.
- BOHÓRQUEZ, W. O. I. et al. Análise exergoeconômica da repotenciação de uma planta de cogeração na indústria açucareira equatoriana, In: CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA MECÂNICA, 4, 2006, Recife. *Anais...* Recife, 2006. 10p. 1 CD-ROM.
- BUSATO, R. *Desempenho de um filtro anaeróbio de fluxo ascendente como tratamento de efluente de reator UASB – estudo de caso da ETE de Imbituva*. 2004. 214f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – MME. *Plano nacional de energia 2030*. Brasília: EPE, 2007. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br>>. Acesso em: 20 set. 2010.
- CAMARGO, C. A. et al. *Conservação de energia na indústria do açúcar e álcool: manual de recomendações*. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1990. 798p.
- CARPIO, R. C. et al. Critérios de avaliação termodinâmica para sistemas de cogeração em usinas de açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA MECÂNICA, 15, 1999, Águas de Lindóia. *Anais...* Águas de Lindóia, 1999. 10p. 1 CD-ROM.
- CORRÊA NETO, V. *Análise de viabilidade da cogeração de energia elétrica em ciclo combinado com gaseificação de biomassa de cana-de-açúcar e gás natural*. 2001. 194f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.
- CORTEZ, L. A. B. et al. Biodigestão de efluentes. In: CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. S. (Coord.) *Biomassa para energia*. Campinas: Editora da Unicamp, 2007.
- D'ÁVILA, S. G. *Curso de economia e tecnologia da energia*. Rio de Janeiro: AIE/Coppe-UFRJ, 1984.
- DIAS, M. O. S. *Simulação do processo de produção de etanol a partir do açúcar e do bagaço, visando a integração do processo e a maximização da produção de energia e excedentes do bagaço*. 2008. 253f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.
- EL-SAYED, Y. M.; EVANS, R. B. Thermoeconomics and the design of thermal systems. *Journal of Engineering for Power-Transactions ASME*, New York, p.27-35. 1970.
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA – EPE. *Balço energético nacional 2010: Ano base 2009*. Rio de Janeiro: EPE, 2010. 276p.
- ENSINAS, A. V. et al. Analysis of cogeneration systems in sugar cane factories: alternatives of steam and combined cycle power plants. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EFFICIENCY, COST, OPTIMIZATION, SIMULATION AND ENVIRONMENTAL IMPACT OF ENERGY SYSTEMS, 19, 2006, Greece. *Proceedings...* Greece, 2006, p.1177-84. 1 CD-ROM.
- ENSINAS, A. V. et al. Analysis of process steam demand reduction and electricity generation in sugar and ethanol production from sugarcane. *Energy Conversion & Management*, Oxford, v.48, p.2978-87, 2007.

- FIOMARI, M. C. *Análise energética e exergética de uma usina sucroalcooleira do oeste paulista com sistema de cogeração de energia em expansão*. 2004. 129f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Ilha Solteira, 2004.
- FRANGOPOULOS, C. A. *Thermoeconomic functional analysis: A method for optimize design or improvement of complex thermal systems*. Atlanta, 1983. Thesis (Ph.D.) – Georgia Institute of Technology.
- GALESNE, A. et al. *Decisões de investimentos da empresa*. São Paulo: Atlas, 1999. 295p.
- GARAGATTI ARRIOLA, D. W. *Sistema tri e tetra combinado de cogeração: avaliação exergética e termoeconômica*. 2000. 206f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000.
- GAS TURBINE WORLD HANDBOOK. Fairfield: Pequot Publishing Inc., USA, 2001-2002. v.22, 208p.
- GITMAN, L. J. *Princípios da administração financeira*. 3.ed. São Paulo: Harba, 1984. 781p.
- HASSUANI, S. J. Atividade 2.3.1 – Summary of Bailing Tests. In: COOPERSUCAR. *Projeto BRA/96/G31 Geração de Energia por Biomassa: bagaço de cana-de-açúcar e resíduos*. Piracicaba: Coopersucar, 1998.
- HASSUANI, S. J. et al. *Biomass power generation: sugar cane bagasse and trash*. Piracicaba: PNUD-CTC, 2005. 217p.
- HIGA, M.; BANNWART, A. C. Cogeração e integração térmica de evaporadores de múltiplos efeitos em usinas de açúcar e álcool. In: CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA MECÂNICA, 2, 2002, João Pessoa. *Anais...* João Pessoa, 2002, 10p. 1 CD-ROM.
- HORLOCK, J. H. *Cogeneration: combined heat and power (CHP): Thermodynamics and Economics*. Florida: Krieger Publishing Company, 1997. 226p.
- JAGUARIBE, E. F. et al. Estudo termodinâmico e análise de custos da ampliação de um sistema de cogeração de energia em uma destilaria de cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS TÉRMI-CAS, 9, 2002, Caxambu. *Anais...* Caxambu, 2002, 9 p. 1 CD-ROM).
- KAMATE, S. C.; GANGAVATI, P. B. Exergy analysis of cogeneration power plants in sugar industries. *Applied Thermal Engineering*, v.29, p.1187-94, 2009.
- KLEIN, S. A.; ALVARADO, F. L. *EES – Engineering Equation Solver*. Middleton: F-Chart Software, WI, 1995.
- KOTAS, T. J. *The exergy method of thermal plant analysis*, Malabar: Krieger, 1985. 328p.
- LARSON, E. D. et al. A review of biomass integrated-gasifier/gas turbine combined cycle technology and its application in sugarcane industries, with an analysis for Cuba. *Energy for Sustainable Development*, v.5, n.1, p.54-76, 2001.
- LEITE, C. P. *Seleção de centrais termoeletricas utilizando gás natural e bagaço de cana*. 2003. 166f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.
- LOBO, P. C. et al. Análise comparativa de sistemas de cogeração usados em duas diferentes plantas sucroalcooleiras. In: CONGRESSO NACIONAL DE ENGE-

- NHARIA MECÂNICA, 2, 2002, João Pessoa. *Anais...* João Pessoa, 2002, 10p. 1 CD-ROM.
- LOBO, P. C. et al. Economics of alternative sugar cane milling options. *Applied Thermal Engineering*, v.27, p.1405-13, 2007.
- LOZANO, M. A.; VALERO, A. Theory of exergetic cost. *Energy*, Oxford, v.18, n.9, p.939-60, 1993.
- NOGUEIRA, M. F. M. Arranjo de megagaseificadores. In: USHIMA, A. H. et al. *Curso de gaseificação*. São José dos Campos: s. n., 2009. 52p.
- NOGUEIRA, L. A. H.; LORA, E. E. S. *Dendroenergia: fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- OLIVEIRA, C. E. L.; HALMEMAN, M. C. R. Implicações do novo modelo do setor elétrico brasileiro no processo de geração distribuída com a utilização do bagaço da cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENERGIA, 11, 2006, Rio de Janeiro, RJ. *Anais...* Rio de Janeiro: Coppe/UFRJ, 2006. 1 CD-ROM.
- PASSOLONGO, R. *Avaliação termodinâmica, termoeconômica e econômica da integração de sistemas de gaseificação da biomassa em uma usina sucroalcooleira*. 2011. 156f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Ilha Solteira, 2011.
- PELLEGRINI, L. F. et al. Supercritical steam cycles and biomass integrated gasification combined cycles for sugarcane mills. *Energy*, Oxford, v.35, p.1172-80, 2010.
- PEREIRA JUNIOR, V. B. *Alternativas para a cogeração de energia em uma indústria de chapas de fibra de madeira*. 2001. 85f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, 2001.
- REISTAD, G. M.; GAGGIOLI, R. A. Available-energy costing. *ACS Symposium Series*, Oxford, n.122, p.143-59, 1980.
- RIPOLI, T. C. et al. Potencial energético de resíduos de cosecha de la caña verde. *STAB: açúcar, álcool e subprodutos*, Piracicaba, v.10, n.1, p.22-8, 1991.
- RODRIGUES, M. et al. Performance evaluation of atmospheric biomass integrated gasifier combined cycle systems under different strategies for the use of low calorific gases. *Energy Conversion & Management*, Oxford, v.48, p.1289-1301, 2007.
- ROMÃO JÚNIOR, R. A. *Análise da viabilidade do aproveitamento da palha da cana-de-açúcar para cogeração de energia numa usina sucroalcooleira*. 2009, 164f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Ilha Solteira, 2009.
- SALOMON, K. R. *Avaliação técnico-econômica e ambiental da utilização do biogás proveniente da biodigestão da vinhaça em tecnologias para geração de eletricidade*. 2007. 219f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Itajubá. Itajubá, 2007.
- SÁNCHEZ PRIETO, M. G. S. et al. Análise do custo exerético do sistema de geração de vapor da Usina Cruz Alta. In: CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA MECÂNICA, 16, 2001, Uberlândia. *Anais...* Uberlândia: Cobem, 2001. v.4, p.196-205.
- SEABRA, J. E. A. *Avaliações técnico-econômica para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil*. 2008. 274f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.

- SIMTECH IPSEPRO. *Process Simulation Environment (PSE)*. Manual version 4.0.001. s. l., 1991-2003.
- SOUZA, M. R. *Co-firing como alternativa para impulsionar a tecnologia de gaseificação da biomassa integrada a ciclos combinados BIG-CC*. 2001. 190f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2001.
- SZARGUT J. et al. *Exergy analysis of thermal, chemical and metallurgical process*. New York: Hemisphere Publishing Corporation, 1988. 332p.
- TORQUATO, S. A.; FRONZAGLIA, T. *Tecnologia BIG-GT: energia a partir da gaseificação da biomassa da cana*. São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, 2005.
- TSATSARONIS, G. Thermoeconomic analysis and optimization of energy system. *Progress in energy and combustion science*, v.19, p.227-57, 1993.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR – UNICA. *Protocolo agro-ambiental do setor sucroalcooleiro*. São Paulo: s. n., 2008. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode={BEE106FF-D0D5-4264-B1B3-7E0C7D4031D6}>>. Acesso em: 31 jan. 2011.
- \_\_\_\_\_. *Dados e cotações: estatísticas*. São Paulo: s. n., 2010. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em: 21 maio 2010.
- WALTER, A.; LLAGOSTERA, J. Feasibility analysis of co-fired combined cycles using biomass-derived gas and natural gas. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON EFFICIENCY, COST, OPTIMIZATION, SIMULATION AND ENVIRONMENTAL IMPACT OF ENERGY SYSTEMS, 19, 2006, Greece. *Proceedings...* Greece, 2006a. v.3. p.931-8. 1 CD-ROM.
- WALTER, A. C. *Viabilidade e perspectivas da cogeração e da geração termelétrica junto ao setor sucroalcooleiro*. Campinas, 1994. 283f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
- ZANETTI, A. A. et al. Use of natural gas in the sugar cane industry: co-firing systems. In: BRAZILIAN CONGRESS OF THERMAL SCIENCES AND ENGINEERING, 11, 2006, Curitiba. *Proceedings...* Curitiba, 2006. 11p. 1 CD-ROM.
- ZULAUF, W. E. et al. Cálculo preliminar da energia liberada anualmente na queima dos canaviais brasileiros. In: SIMPÓSIO SOBRE QUEIMA DE PALHA DE CANAVIAIS, 2, 1985, Araraquara. *Anais...* Araraquara, 1985.

## **Parte IV**

Biorrefinarias, alcoolquímica  
e oleoquímica





## 21

# Da biotecnologia à biorrefinaria

*Jonas Contiero, Roberta Barros Lovaglio,  
Fabricio Coutinho de Paula, Paulo Avila Neto,  
Mariana Cortezi, Mary Helen Palmutti,  
Luciana Fontes Coelho, Kate Cristina Blanco*

### Introdução

Recentes avanços na biotecnologia e a grande preocupação atual com os efeitos provocados no meio ambiente, além da sustentabilidade que pode ser obtida por meio das fontes de recursos naturais, têm direcionado para uma mudança de paradigma em relação às indústrias químicas, principalmente no que concerne a obtenção de produtos que podem ser produzidos mediante via microbiana. Atualmente grandes indústrias farmacêuticas têm dedicado parte do desenvolvimento de suas pesquisas à área de bioprocessos. Pode-se observar um grande movimento industrial preocupado em desenvolver seus produtos tendo por base a biomassa, e não mais os insumos da indústria petrolífera. Embora o potencial em termos de petróleo seja enorme, deve-se ressaltar que hoje em dia a procura por produtos denominados amigos do meio ambiente já é uma realidade. Hoje é notório que grandes indústrias da área de petróleo têm dirigido seus departamentos de pesquisa para a área de transformação da biomassa reutilizável. Aliado a esse fato deve-se ressaltar o grande potencial brasileiro em termos de áreas agriculturáveis e o resíduo dessa agroindústria que pode ser aproveitado para a produção de insumos com alto valor agregado. Neste capítulo pretende-se introduzir algumas importantes aplicações em biotecnologia

e recentes desenvolvimentos de tecnologias de bioprocessamento para a utilização de biomassa, com foco principal na bioconversão industrial das fontes renováveis em químicos de interesse. O conceito e os princípios de biorrefinaria integrada para a obtenção de alimentos, energia e produtos industriais também serão tratados aqui.

## **Biотecnologia industrial: história e aplicação**

A biotecnologia tem sido apontada como a grande inovação do século XX e tem sido aplicada a diversos segmentos da vida humana, desde a produção de insumos para a saúde humana e para a agricultura até a produção de insumos industriais, como pode ser observado através da Figura 21.1. Biotecnologia, no sentido mais amplo, pode ser definida como o uso de microrganismos vivos ou parte deles para fazer ou modificar produtos, desenvolver plantas ou animais ou desenvolver outros microrganismos para usos específicos. O uso da biotecnologia já é conhecido desde 6000 a.C., quando nossos ancestrais faziam uso de alimentos e bebidas fermentados, mas o conhecimento do ser responsável pela transformação somente veio a ser conhecido em 1857, quando Pasteur mostrou ser um microrganismo o responsável por essa transformação. Em 1910, a indústria de fermentação nasce e se torna rapidamente uma potência na produção de etanol e solventes (acetona e butanol), continuando a se desenvolver com a produção de ácido cítrico e penicilina em 1923 e 1944, respectivamente. Com a descoberta do petróleo e o desenvolvimento da indústria petrolífera em 1950, os insumos produzidos por fermentação tendo como fonte de carbono o açúcar foram substituídos por derivados do petróleo, utilizando-se da síntese química.

Após a primeira crise do petróleo, na década de 1970, crescem as discussões sobre a exaustão do combustível fóssil e aumenta a preocupação com pesquisas sobre o desenvolvimento de tecnologias com base em fontes renováveis de energia; entretanto, com algumas exceções, o baixo custo do petróleo não permitiu o desenvolvimento mais profundo daquelas pesquisas. Entretanto, com as discussões atuais em torno da mudança da matriz energética, a questão da sustentabilidade e a procura por processos menos agressivos ao meio ambiente, associados ao preço do petróleo, a produção

de insumos com base na biotecnologia tornou-se atrativa. A Tabela 21.1 mostra a evolução da biotecnologia, e a Tabela 21.2 nos permite verificar a produção atual de insumos obtidos por meio da fermentação.

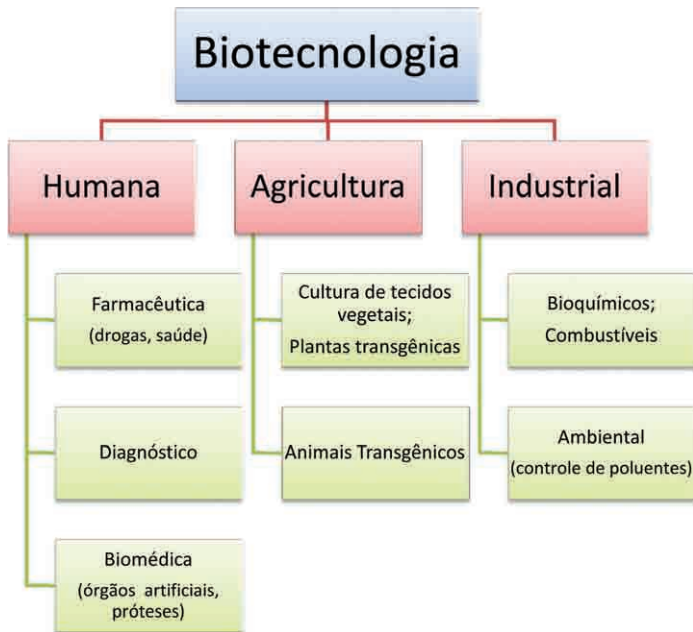


Figura 21.1 – Aplicações da biotecnologia em vários setores do mercado

Tabela 21.1 – Desenvolvimento histórico da biotecnologia

Ano	Evento
6000 a.C.	Bebidas alcoólicas, pão e queijo obtidos por fermentação.
1857	Pasteur prova que a fermentação é causada por microrganismo.
1910	Desenvolvimento da indústria de fermentação (combustíveis e produção de solvente).
1923	Produção de ácido cítrico por fermentação.
1944	Produção de penicilina.
1953	Elucidação da estrutura do DNA.
1973	A tecnologia do DNA recombinante torna possível a engenharia genética.
1982	Produção comercial de proteína recombinante (produção de insulina humana).

Tabela 21.2 – Produção de aminoácidos via fermentação

Aminoácido	Produção
L-glutamato	1,5 tonelada (fermentação)
L-lisina	600 mil toneladas (fermentação-170g/L)
DL-metionina	50 mil toneladas (síntese química)
Glicina	22 mil toneladas (síntese química)
L-treonina	20 mil toneladas (fermentação-100g/L)
L-ácido aspártico	10 mil toneladas (catálise enzimática)
L-fenilalanina	10 mil toneladas (fermentação-50g/L)
L-cisteína	3 mil toneladas (catálise enzimática)
L-glutamina	2.200 toneladas (fermentação)
L-arginina	1.000 toneladas (fermentação)
L-triptofano	500 toneladas (fermentação)
L-valina	500 toneladas (fermentação)
L-leucina	500 toneladas (fermentação)

Fonte: Demain, 2010

A crise do óleo em 1970 trouxe preocupações em relação à exaustão do petróleo e deixou claro que o desenvolvimento econômico tendo por base a indústria petrolífera não era sustentável. Embora houvesse extensiva preocupação no desenvolvimento de tecnologia por meio de fontes renováveis, o preço baixo do petróleo não permitiu o seu desenvolvimento. Somente agora, com o preço alto do petróleo e a grande preocupação em relação ao meio ambiente, aliados à busca de novas alternativas em termos de energia e produtos obtidos de fontes renováveis, está-se permitindo a mudança de paradigma em relação à produção de energia no mundo. No momento atual a indústria de fermentação tem como produtos drogas, alimentos e alimentos animais, além do etanol, que é um dos produtos líderes em termos de mercado. A Tabela 21.3 traz alguns metabólitos primários obtidos por mutagenese e seleção – técnica genética moderna –, microbiologia industrial e uso de engenharia bioquímica, mostrando que os microrganismos utilizados produzem em excesso em relação ao necessário para seu crescimento.

Altos níveis de ácidos orgânicos são obtidos por meio da microbiologia industrial, podendo ser citado o ácido lático, com uma produção de 250 mil toneladas por ano.

Tabela 21.3 – Superprodução de alguns metabólitos primários

Produto	Requerido para crescimento (mg/L)	Produção (mg/L)	Razão produção/requerido
Lisina	250	100 mil	4x10 <sup>2</sup>
Ácido glutâmico	300	125 mil	4x10 <sup>2</sup>
Ácido inosínico	25	30 mil	1,2x10 <sup>3</sup>
Riboflavina	0,5	25 mil	5x10 <sup>4</sup>
Vitamina B12	0,0001	150	1,5x10 <sup>4</sup>

Fonte: Demain, 2010

Tabela 21.4 – Produção de ácidos orgânicos

Ácidos orgânicos	Produção
L(+) Láctico	195g/L ( <i>Lactobacillus lactis</i> )
D(-) Láctico	120g/L ( <i>Corynebacterium glutamicum</i> )
Ácido kójico	41g/L ( <i>Aspergillus oryzae</i> )
Ácido pirúvico	135g/L ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
Ácido glucônico	504g/L ( <i>Aureobasidium pullulans</i> )
Ácido fumárico	107g/L ( <i>Rhizopus arrhizus</i> )
Ácido succínico	146g/L ( <i>Corynebacterium glutamicum</i> )
Ácido málico	113g/L ( <i>Aspergillus flavus</i> )
Ácido cítrico	200 g/L ( <i>Aspergillus niger</i> )
Ácido chiquímico	90g/L ( <i>Escherichia coli</i> )

Fonte: Sanches e Demain, 2008

A biotecnologia tem atuado em vários setores, como se destaca a seguir.

## Indústria farmacêutica

Após a elucidação do DNA por Watson e Crick, em 1953, avanços na biologia molecular e no desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante permitiram o nascimento da indústria de biotecnologia atual. O desenvolvimento da primeira proteína humana para fins terapêuticos (insulina humana), em 1982, permitiu que ocorresse uma grande aplicação de recursos no desenvolvimento de drogas terapêuticas. Hoje estima-se que o mercado está acima de US\$400 bilhões e que 20% da produção de insumos ocorram por via biotecnológica, quando não somente a tecnologia do DNA recombinante é utilizada, mas também a biocatálise, a qual utiliza enzimas ou células como catalisador.

Tabela 21.5 – Mercado de anti-infectivo em 2000

Composto	Valor de mercado (US\$)
Cefalosporina	9,9 bilhões
Penicilinas	8,2 bilhões
Outros beta-lactamas	1,5 bilhão
Antivirais (excluindo vacinas)	10,2 bilhões
Quinolonas	6,4 bilhões
Antifúngicos e antiparasitas	4,2 bilhões
Aminoglicosídeos	1,8 bilhão
Tetraciclina	1,4 bilhão
Outros antibactericidas	6,1 bilhões
Outros anti-infectivos	5,3 bilhões
Total	55 bilhões

Fonte: Demain, 2010

## Agricultura e alimentos

A biotecnologia também tem tido um grande impacto sobre as indústrias agrícola e de alimentos. Plantas transgênicas e culturas que contribuíram para o aumento da produtividade agrícola são utilizadas na produção de alimentos e ração animal. Culturas transgênicas já eram avaliadas em mais de US\$20 bilhões em 2002, e espera-se rápido aumento desse valor com o uso de plantas transgênicas para produzir produtos farmacêuticos, produtos químicos e combustíveis (Gavrilescu e Chisti, 2005). Além disso, grandes empresas agrícolas no Brasil vêm expandindo agressivamente seus negócios no mercado de produtos de valor agregado para além do alimento tradicional humano e animal.

## Indústria química

A indústria química é uma das maiores indústrias de transformação, e consiste em quatro setores principais: produtos químicos de *commodities*, especialidades químicas, produtos de higiene e produtos farmacêuticos, com mais de US\$2 trilhões em vendas em todo o mundo (Willke e Vorlop, 2004). A biotecnologia pode oferecer benefícios econômicos e ambientais para a indústria química e tem um grande potencial para alcançar a produção sustentável de produtos existentes e novos a partir de matérias-primas

renováveis. Com poucas exceções, a produção de insumos químicos tem sido, em grande parte, construída sobre a plataforma de hidrocarbonetos. Como a produção de energia não renovável de fóssil tem seu custo cada vez mais oneroso e, conseqüentemente, preços ao consumidor cada vez mais altos nesses últimos anos, o interesse em produzir esses insumos sobre outra plataforma em que se utilizem fontes renováveis tem crescido. O potencial para aplicações biotecnológicas nas indústrias químicas e de energia é enorme, embora até agora o impacto da biotecnologia nesses setores do mercado seja muito pequeno em termos de vendas e quota de mercado. Essa mudança é esperada para os próximos anos, uma vez que várias grandes empresas químicas e agrícolas desenvolveram novas tecnologias para produzir economicamente produtos químicos de base biológica, substituindo assim aqueles obtidos por meio da indústria de petroquímicos e produtos derivados de combustíveis fósseis.

A produção biotecnológica de substâncias químicas é menos agressiva ao meio ambiente (ambientalmente amiga) do que os métodos químicos, porque biocatalisadores (enzimas ou células) são altamente seletivos, resultando em maior rendimento do produto, com menos ou nenhum subproduto, os quais geralmente são difíceis de separar. A síntese química muitas vezes requer solventes tóxicos e gera grandes quantidades de resíduos, causando problemas de poluição. Um exemplo é a produção de cefalexina, um antibiótico semissintético derivado de cefalosporina C. Métodos de fermentação e enzimático podem reduzir o número de etapas e ao mesmo tempo diminuir a formação de resíduos (Vandamme e Bienfait, 2004). Um processo enzimático para a acrilamida desenvolvido pela Mitsubishi Rayon usa aproximadamente 20% menos energia que o processo tradicional. Também a DuPont e a Genencor desenvolveram processo de produção de 1,3 propanodiol por *E. coli* recombinante a partir de milho como fonte de carbono (Kurian, 2005). Esse insumo (1,3 propanodiol) produzido por meio da biotecnologia é elemento básico na produção de polímero e consome de 30% a 40% menos energia (Anonymous, 2006). A Nature Works produz ácido polilático (PLA) de ácido láctico a partir de milho como fonte de carbono. O uso de PLA biodegradável deve crescer rapidamente em materiais de embalagem e em fibras têxteis, assim como em aplicações médicas e farmacêuticas. A Dow Chemical e a ADM estão desenvolvendo polióis a partir de fontes renováveis, como carboidratos e glicerol. Além disso, a



DSM está comercializando produtos derivados do ácido succínico obtido a partir do milho. Outro insumo de grande perspectiva futura são os polihidroxicanoatos (PHA), obtidos a partir de fontes renováveis e que podem substituir polímeros que são produzidos pela indústria petrolífera. Esses polímeros podem substituir poliésteres, poliacrílicos, poliamidas e poliuretanos (Willke e Vorlop, 2006).

## **Combustível e energia**

A biomassa tem potencial energético tanto como combustível para aquecimento e geração de energia quanto como matéria-prima para a produção de produtos químicos e materiais. Combustíveis e produção de energia a partir de biomassa representam, portanto, outro segmento de mercado importante para a biotecnologia. Biocombustíveis, incluindo etanol, biodiesel, butanol, metano e hidrogênio, podem ser produzidos a partir de recursos renováveis em substituição de alguns combustíveis fósseis. O Brasil aumentou sua área de plantação de cana-de-açúcar para a produção de etanol, com uma produção anual acima de 15 bilhões de litros, satisfazendo mais de 33% da demanda de gasolina no país (Lin e Tanaka, 2006). Materiais lignocelulósicos são os mais abundantes recursos renováveis na Terra, e as novas tecnologias estão sendo desenvolvidas para seu uso, no futuro, de forma mais econômica como matéria-prima para combustíveis e produtos químicos (Lynd et al., 2005).

Após esse breve relato sobre as possibilidades do uso de biomassa na produção de energia e insumos, apresentamos alguns exemplos de como o setor de biotecnologia poderia desenvolver processos para a produção de determinados insumos, que são, na maioria, importados e que, caso fossem produzidos no Brasil, fariam frente ao mercado internacional, uma vez que possuímos a biomassa necessária tal realização.

## **Polihidroxicanoatos (PHA) e glicerol de biodiesel: um futuro a partir de fontes de energias renováveis**

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de tecnologias em ciências de materiais possibilitou a criação de polímeros sintéticos com diferentes pro-

priedades físico-químicas, originando produtos plásticos com uma maior integridade mecânica e excelente durabilidade. Esse progresso contribuiu para um aumento notável da versatilidade desses produtos, os quais passaram a ser utilizados em diversas aplicações, especialmente na indústria médica e alimentícia, resultando em um aumento da produção mundial de plásticos de 1,5 milhão de toneladas em 1950, para 245 milhões de toneladas em 2008. Assim, o estabelecimento de uma sociedade caracterizada pelo alto consumo desses produtos, associado à incidência significativa de descarte inapropriado destes, passou a ser um sério problema para a administração pública, já que esses polímeros sintéticos, geralmente derivados do petróleo, não são biodegradáveis e acabam por ser extremamente persistentes no meio-ambiente, acumulando-se nos ecossistemas (Chanprateed, 2010).

Ao lado do impacto ambiental gerado pela utilização de produtos plásticos, tem-se verificado um aumento gradativo sobre o preço do petróleo e de seus derivados. Estimativas apontam um declínio significativo na produção desse combustível fóssil desde 2010, até sua total escassez em 2050, tornando-se necessário o estabelecimento de fontes de energia alternativas e ecologicamente viáveis, em substituição aos produtos derivados do petróleo. Dessa forma, a produção de polímeros biodegradáveis a partir de fontes renováveis tornou-se atrativa industrialmente (Silva, Mack e Con-tiero, 2009).

Entre os biopolímeros, os polihidroxialcanoatos (PHA) têm recebido considerável atenção devido ao seu alto potencial de biodegradação. Os PHA representam uma classe de polímeros produzidos por meio da fermentação bacteriana, sendo sintetizados e acumulados como reserva de carbono por esses microrganismos. O polímero obtido geralmente apresenta de  $10^3$  a  $10^4$  monômeros, podendo ser acumulado por bactérias gram-positivas e negativas na forma de inclusões citoplasmáticas com 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Anderson e Dawes, 1990; Steinbüchel, 1991; Steinbüchel e Füchtenbusch, 1998). A estrutura, as propriedades físico-químicas, a composição monomérica, o número e o tamanho dos grânulos são variáveis e dependem do microrganismo produtor. Esses polímeros são semicristalinos e, dependendo de sua composição, podem apresentar temperaturas de fusão variando entre  $120^\circ\text{C}$  e  $180^\circ\text{C}$ . Os PHA são compostos de monômeros de ácidos hidroxialcanoicos e/ou hidroxialcenoicos, formando poli-

ésteres de cadeia alifática, apresentando uma grande variedade estrutural. Por meio do tipo de microrganismo ou substrato utilizado durante o crescimento, as moléculas dos monômeros obtidos podem conter um simples radical metil a estruturas funcionais, contendo ligações insaturadas duplas ou triplas, halogênios ou grupos benzil, cianida e até epóxi. A estrutura e a composição dos monômeros influenciam diretamente nas propriedades físicas desses polímeros. Os PHA podem ser quebradiços, como o poli-hidroxi-butarato (PHB), produzido por várias espécies de bactérias; flexíveis, como os PHB-co-HV, os quais consistem em um copolímero formado de 3-hidroxi-butarato (HB) e 3-hidroxi-valerato (HV); além dos PHB-co-HHx, copoliésteres compostos por HB e 3-hidroxi-hexanoato (HHx). Também podem apresentar propriedades elastoméricas quando constituídos pelos monômeros 3-hidroxi-octanoato (3HO) e 3-hidroxi-decanoato (3HD) (Chen, 2003).

Entre todos os PHA caracterizados, os grupos alquil, os quais ocupam a configuração "R" no carbono C-3 da molécula de éster, variam de um átomo de carbono (C-1) até mais que quatorze carbonos (C-14) por monômero. Assim, os PHA podem ser classificados em três maiores classes, por meio do número de átomos de carbono presentes em sua estrutura monomérica: PHA de cadeia curta ou scl-PHA (*short chain length-PHA*), com seus monômeros constituídos por até cinco átomos de carbonos; PHA de cadeia média ou mcl-PHA (*medium chain length-PHA*), apresentando monômeros com seis a quatorze carbonos; e por fim, PHA de cadeia longa ou lcl-PHA (*long chain length-PHA*), cujos monômeros contêm mais de quatorze átomos de carbono (Suriyamongkol et al., 2007).

Os microrganismos capazes de acumular PHA são geralmente bactérias gram-positivas e negativas, existindo mais de 300 espécies, distribuídas em mais de 75 gêneros diferentes, as quais produzem mais de 150 tipos desse polímero. De um modo geral, a produção de PHA pode ser dividida em duas vias, de acordo com as características de acúmulo desse polímero. Na primeira, o PHA começa a ser produzido quando há um excesso de fonte de carbono e o crescimento celular é interrompido pela ausência de um nutriente essencial, como o N, P, Mg, K ou S. A segunda apresenta produções de PHA associadas ao crescimento celular. A bactéria *Cupriavidus necator* (classificada anteriormente como *Alcaligenes eutrophus*, depois como *Ralstonia eutropha*, e por último como *Wautersia eutropha*), uma conhecida

produtora de PHA, pertence ao primeiro grupo, enquanto *Alcaligenes lactus*, *Azotobacter beijerinckii* e *E. coli* recombinante pertencem ao segundo. Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias de cultivo para cada tipo de microrganismo torna-se fundamental. As bactérias produtoras de PHA em condições limitantes de nutrientes apresentam melhores produções em sistemas de batelada dividida em duas etapas, enquanto os microrganismos produtores associados ao crescimento demonstram melhores resultados em sistemas de alimentação contínua (ibidem).

Entre uma grande variedade de bactérias produtoras de PHA, o PHB é o polímero mais comumente encontrado entre diversas espécies. Embora outros tipos de PHA sejam observados, o PHB, o PHB-co-HV e o PHB-co-HHx são os mais produzidos industrialmente e explorados em escala comercial. A produção industrial de PHA exige linhagens de microrganismos com o máximo de características associadas às melhoras de produção, tais como rápido crescimento em fontes de carbono de baixo custo, alta porcentagem de acúmulo de PHA, alta eficiência de transformação do substrato em produto, obtenção de um polímero facilmente extraído das células bacterianas e bem adaptado às técnicas de separação, além de apresentar-se inofensivo a seres humanos, animais e ao meio ambiente. Ainda, uma linhagem bacteriana ideal para a produção de PHA deve apresentar baixa demanda de oxigênio, observando-se um crescimento com alta densidade de células e baixa limitação por oxigênio, produzindo polímeros de alto peso molecular. Devido à grande dificuldade de isolamento de uma linhagem bacteriana adaptada às condições ideais, a produção industrial desse biopolímero tem-se concentrado na obtenção de PHA a partir de *Alcaligenes latus* e *Cupriavidus necator* (Chen, 2003).

Atualmente, um pequeno grupo de bactérias, principalmente espécies de *Pseudomonas*, tem despertado interesse na produção de PHAmcl. Além disso, com o desenvolvimento dos estudos genéticos referentes à síntese de PHAmcl, tem-se isolado genes na tentativa de compreender a dinâmica do metabolismo dessas bactérias, estabelecendo uma relação com a produção de PHA a partir de ácidos graxos e outras fontes de carbono menos convencionais.

As aplicações dos PHA estão diretamente relacionadas às propriedades desses polímeros, sendo termoplásticos e/ou elastômeros, insolúveis em água, não apresentam toxicidade e são biocompatíveis, características que

os tornam atraentes para a indústria, sendo utilizados na elaboração de produtos de higiene e embalagens, além de aplicações no setor médico e farmacêutico, particularmente na produção de cápsulas de medicamentos e drogas agrícolas, também sendo utilizados na obtenção de próteses e enxertos de tecidos humanos e na medicina veterinária. O PHB possui características similares ao polipropileno (PP), de origem petroquímica, ambos apresentando um alto grau de cristalinidade e temperaturas de fusão muito próximas. Como já foi mencionado, essas características podem ser alteradas com a adição de outros PHA, como o 3-hidroxicvalerato (3HV), formando um copolímero com propriedades termomecânicas diferenciadas. O copolímero com até 24% de 3HV produzido por *Cupriavidus necator* tem sido comercializado desde 1976, quando a empresa inglesa Imperial Chemical Industries começou a produzi-lo com o nome comercial Biopol®. No entanto, mesmo diante de várias características interessantes para a indústria, a ampla introdução desses biopolímeros no mercado ainda torna-se inviável devido aos elevados custos envolvidos no seu processo de produção. Até 2006, as médias de preços observadas na comercialização de PHB e alguns copolímeros, como o PHB-HV, ainda eram muito superiores às de outros biopolímeros, devido aos custos referentes à matéria-prima para os cultivos, além da extração e processamento desses polímeros. A partir de 2010, por meio do desenvolvimento de novas tecnologias e recentes investimentos na produção de PHA, preços menores foram observados no mercado, com cotações próximas de US\$ 2.00/kg. No entanto, esses avanços ainda se distanciam muito dos preços de mercado dos polímeros de origem petroquímica, como o polipropileno, cujas cotações atingem no máximo US\$ 0.70/kg. Os custos destinados à compra de matéria-prima para os cultivos de produção de PHB podem chegar a 40% da demanda total (Chanprateed, 2010). Portanto, a utilização de fontes de carbono e outros nutrientes de baixos valores de mercado, assim como o emprego de subprodutos industriais como insumos de cultivo, vem tornando-se uma boa alternativa na minimização dos custos de produção de PHA. Outra solução viável seria vincular o processo de obtenção desses biopolímeros à cadeia de produção de outros produtos provenientes de fontes renováveis, principalmente os biocombustíveis, podendo, por meio da utilização de seus subprodutos, gerar uma linha de produção de combustíveis e polímeros independentes daqueles derivados do petróleo e, ao mesmo

tempo, agregar valor a ambos os produtos, viabilizando seus processos de produção.

Atualmente, as tecnologias mais difundidas e comumente aplicadas na obtenção de combustíveis a partir de fontes renováveis são a produção de etanol por meio da fermentação de açúcares provenientes da cana-de-açúcar, do milho e da beterraba, e a produção de biodiesel mediante a transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com álcool para a produção de ésteres (Yazdani e Gonzalez, 2007). Entre os combustíveis alternativos, o biodiesel tornou-se uma excelente opção devido às suas propriedades similares às do óleo diesel, podendo ser utilizado em misturas com este combustível ou substituindo-o totalmente sem a necessidade de ajustes nos motores, aumentando a vida útil destes por ser um ótimo lubrificante. O biodiesel apresenta ainda menores riscos de explosão e, dessa forma, pode ser mais facilmente armazenado e transportado. Além disso, sua queima produz menos poluentes, e sua utilização contribui para a diminuição do efeito estufa (Yuste e Dorado, 2006).

O estabelecimento do segmento de mercado do biodiesel e a crescente adoção desse combustível em programas de matrizes energéticas de diversos países, resultando na superprodução do subproduto glicerol, provocaram um aumento do número de pesquisas em biotecnologia voltadas para o desenvolvimento de novas técnicas de conversão e aprimoramento das vias de fermentação desse subproduto. A produção de glicerol é equivalente a cerca de 10% do volume total de biodiesel produzido, e a utilização desse subproduto tornou-se um desafio, pois seu emprego na indústria de alimentos e cosméticos é inviável sem um pré-tratamento e posteriores processos de purificação. Assim, despertou-se o interesse pelo desenvolvimento de tecnologias de síntese de PHA, utilizando esse subproduto como fonte de carbono em processos fermentativos.

A síntese de PHA a partir de glicerol pode ser considerada uma síntese a partir de um substrato não relacionado, onde, geralmente, ocorre a redução da molécula de glicerol a acetil-CoA, produzindo variados tipos de monômeros de PHA, dependendo da linhagem bacteriana utilizada em cultivo. As linhagens de *P. aeruginosa* apresentam uma composição de monômeros essencialmente formada de HD (~70%), HO (~20%-25%), HHx (~5%) e HDd (~5%) (Huijberts et al., 1992). Diferenças na proporção entre esses

monômeros obtidos poderiam ser atribuídas a uma deficiência na assimilação da fonte de carbono (glicerol) na formação de um polímero típico.

Alguns pesquisadores têm relatado produções de PHA a partir de glicerol puro. Koller et al. (2005) realizaram experimentos em biorreatores obtendo esses polímeros a partir de soro hidrolisado de leite e glicerol líquido utilizando um microrganismo altamente osmofílico. Na ausência de precursores, observou-se a produção de PHB-co-HV em ambas as fontes de carbono. Nesses processos fermentativos também se utilizou como fonte de nitrogênio o extrato de carne e farinha de osso, juntamente com a adição de glicerol como fonte de carbono, resultando na produção de PHA. Costa et al. (2009), em seus estudos com linhagens de *P. aeruginosa*, também realizaram experimentos utilizando glicerol para a obtenção simultânea de PHA e biossurfactantes. As linhagens LMI 6c e 7a apresentaram valores de 22,2% e 16,8% de acúmulo de polímero celular, respectivamente. No entanto, ainda são escassos trabalhos publicados sobre a produção desses polímeros utilizando glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel. A utilização de glicerol bruto nos meios de cultivo muitas vezes exerce um efeito negativo sobre o crescimento celular e acúmulo de polímero. Tal fato deve-se à presença de íons de sódio nesse insumo, provenientes do catalisador NaOH utilizado no processo de transesterificação de óleos e gorduras, realizado para a produção de biodiesel. O excesso desses íons provavelmente provoca mudanças na permeabilidade da membrana celular dos microrganismos, dificultando o acesso à fonte de carbono. Mothes et al. (2007) avaliaram a produção de PHB utilizando glicerol puro e glicerol bruto proveniente de diferentes usinas de biodiesel. Em seus experimentos, observaram o acúmulo intracelular do polímero em duas espécies bacterianas, *Paracoccus denitrificans* e *Cupriavidus necator* (anteriormente classificada como *Ralstonia eutropha*), sendo esta última largamente conhecida por sua capacidade em produzir altas concentrações celulares de PHB. Os maiores acúmulos celulares de polímeros foram obtidos nos cultivos com *C. necator* a partir de glicerol puro (70%). Ao utilizar glicerol bruto, foi relatado um efeito negativo sobre o crescimento celular e o acúmulo de polímero. Nos ensaios com esse substrato foi observado um máximo acúmulo de 48% da massa seca celular (MSC) obtida. Esses efeitos também foram relatados por Cavalheiro et al. (2009), apresentando um acúmulo máximo de polímero a partir de glicerol bruto de 38% da MSC utilizando uma linhagem de *C.*

*necator*. Ashby, Solaiman e Foglia (2004) realizaram cultivos com linhagens de *P. corrugata* e *P. oleovorans* utilizando glicerol bruto (subproduto de usina de biodiesel com 40% de glicerol e 36% de ácidos graxos e ésteres) para a produção de PHA. Os experimentos foram conduzidos a 30°C por 72 horas, variando-se concentrações desse insumo de 1% a 5%. A maior produção de polímero foi verificada em 5% de glicerol bruto para *P. oleovorans* (0,4g/L) e em 2% desse insumo para *P. corrugata* (0,7g/L).

Embora alguns trabalhos científicos venham sendo observados nessa recente linha de pesquisa científica, ainda torna-se necessária a descoberta de novos microrganismos capazes de utilizar o glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel para a obtenção de PHA, além da elaboração e otimização de técnicas de cultivo empregadas na produção desses compostos a partir desse subproduto. Dessa forma, estabelece-se um novo desafio biotecnológico fundamentado na elaboração de uma cadeia de produção de biodiesel e biopolímeros, visando à obtenção de novas “*commodities*” a partir de fontes renováveis.

## Biossurfactantes

Os biossurfactantes são detergentes biológicos sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos cultivados em diferentes fontes de carbono. Esses compostos são constituídos por uma porção hidrofóbica, usualmente uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica que pode ser um éster, um grupo hidroxil, fosfato, carboxilato ou carboidrato (Cameotra e Makkar, 1998).

As porções hidrofílicas e hidrofóbicas presentes na molécula de surfactante tendem a se distribuir na interface de fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). Esta distribuição das moléculas é responsável pela principal propriedade desses compostos, que é a capacidade de redução das tensões superficial e interfacial. Essas propriedades os tornam adequados para serem utilizados em diferentes aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (Banat et al., 2000).



Os surfactantes sintéticos são usualmente classificados de acordo com o grupo polar, entretanto os biosurfactantes são diferenciados com base em sua natureza bioquímica. As principais classes de biosurfactantes incluem os glicolipídios, os lipopeptídios e a lipoproteína, os ácidos graxos e os fosfolipídios e biosurfactantes poliméricos (Makkar e Cameotra, 2002). A Tabela 21.6 mostra as principais classes de biosurfactantes e os respectivos microrganismos produtores.

Tabela 21.6 – Principais classes de tensoativos produzidos por microrganismos

<b>Biotensoativo</b>	<b>Microrganismo</b>
<b>Glicolipídios</b>	
Ramnolipídios	<i>Pseudomonas</i> sp.
	<i>Burkholderia</i> sp.
Trealolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	<i>Nocardia erythropolis</i>
	<i>Mycobacterium</i> sp.
Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T.</i>
	<i>Apícola</i> e <i>T. petrophilum</i>
Celobiolipídios	<i>Ustilago zaeae</i>
	<i>Ustilado maydis</i>
<b>Lipopeptídios e lipoproteínas</b>	
Peptidolipídio	<i>Bacillus lincheformis</i>
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>Ácidos graxos, fosfolipídios</b>	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
Emulsan	<i>Anthrobacter calcoaceticus</i>

Fonte: Modificado de Desai e Banat, 1997

Os ramnolipídios sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* são glicolipídios cuja porção hidrofílica é composta por moléculas de ramnose, e a porção hidrofóbica, por ácidos hidroxialcanoicos. Esses biotensoativos podem reduzir a tensão superficial da água de 72mN/m para 30mN/m (Abalos et al., 2001), e sua concentração micelar crítica está entre 50mg/l e 65mg/L (Mata-Sandoval et al., 1999).

Os biossurfactantes produzidos por microrganismos vêm despertando considerável interesse nos últimos anos devido à sua natureza biodegradável, baixa toxicidade e diversidade de aplicações. Apesar das vantagens apresentadas, os biotensoativos não são amplamente utilizados comercialmente devido aos altos custos de produção, o que está associado à baixa produtividade e ao uso de substratos caros.

De acordo com Mukherjee et al. (2006), três estratégias devem ser adotadas para tornar os custos do processo de produção mais baixos: (1) substrato – utilização de resíduos ou matéria-prima de baixo custo; (2) desenvolvimento de bioprocessos eficientes para a produção e recuperação do produto, incluindo otimização das condições de cultivo; e (3) desenvolvimento de mutantes ou linhagens recombinantes para aumentar o rendimento do biossurfactante.

## Fatores que influenciam a produção

Entre os parâmetros que influenciam o tipo e a quantidade de produto formado estão a natureza da fonte de carbono, possíveis limitações nutricionais e parâmetros físicos e químicos, como aeração, agitação, geração de espuma, temperatura e pH (Fiechter, 1992; Chang et al., 2005).

Elevadas proporções C/N (Guerra-Santos et al., 1984; Raza et al., 2007; Wu et al., 2007) e C/P (Mulligan et al., 1989) estimulam a síntese de ramnolipídios, enquanto altas concentrações de cátions bivalentes, especialmente ferro, são inibitórias (Guerra-Santos et al., 1986; Venkata, Ramana e Karanth, 1989). Benincasa e Accorsini (2008) avaliaram a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI sob diferentes proporções C/N e alcançaram a mais alta concentração, 7,3g/L, com a proporção C/N de 8/1. A utilização de  $\text{NH}_4^+$ , glutamina, asparagina e arginina como fonte de nitrogênio inibe a produção de ramnolipídios, enquanto  $\text{NO}_3^-$ , glutamato e aspartato promovem a síntese (Mulligan e Gibbs, 1989; Venkata, Ramana e Karanth, 1989; Köhler et al., 2000). De acordo com alguns autores, o nitrato é a melhor fonte de nitrogênio a ser utilizada, pois estimula uma alta expressão de rhlAB, que é o principal gene responsável pela síntese de ramnolipídios (Venkata, Raman E Karanth, 1989; Manresa et al., 1991; Arino et al., 1996; Henning et al., 2008). De acordo com Manresa et al. (1991), a preferência por essa fonte de nitrogênio pode ser devido ao fato de

*P. aeruginosa* ser apta a fazer desnitrificação e, portanto, poderia se utilizar nitrato como aceptor de elétrons, mesmo na presença de oxigênio.

Fatores ambientais e condições de crescimento, como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio, afetam a produção de biossurfactantes, interferindo no crescimento e na atividade celular (Desai e Banat, 1997). A produção de ramnolipídios por *Pseudomonas* sp. foi máxima quando o pH foi mantido entre 6 e 6,5; já acima de 7, a produção caiu bruscamente (Guerra-Santos et al., 1984).

Durante a produção por leveduras, a síntese de biossurfactantes aumentou quando as taxas de agitação e aeração foram elevadas (Yeh et al., 2006). Para Sheppard e Cooper (1990), a transferência de oxigênio é um dos parâmetros-chaves para a otimização e produção em grande escala de surfactina por *B. subtilis*.

Um desafio enfrentado durante a produção aeróbica de biossurfactante é a formação de um grande volume de espuma, devido à agitação e aeração do caldo de cultivo (Chayabutra et al., 2001). Com a finalidade de reduzir o volume de espuma, Adamczak e Bednarski (2000) adicionaram 4% de óleo de soja após 48 horas e 96 horas de cultivo, porém houve queda na produção de 45g/L para 28g/L. Uma alternativa encontrada por Müller et al. (2010) foi o emprego de um quebrador mecânico de espuma, o que permitiu aumentar o volume de trabalho do reator sem que houvesse perda de fermentações devido ao extravasamento de meio fermentado, o que, além de prejuízos financeiros devido à perda de produtividade, aumenta os riscos de contaminação (Abdel-Mawgoud et al., 2011).

## **Substratos alternativos: resíduos agroindustriais como fonte de carbono**

A utilização de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo, tais como subprodutos agrícolas ou de processamento industrial, pode reduzir o problema econômico da produção de biossurfactantes. Estima-se que a matéria-prima seja responsável por cerca de 10% a 30% dos custos totais de produção em muitos processos biotecnológicos (Mukherjee et al., 2006). Além disso, o aproveitamento de resíduos pode contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica dos resíduos que seriam descartados.

O glicerol é um subproduto que corresponde a 10% (v/v) da produção de biodiesel (Mu et al., 2006). No Brasil, a adição de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo (B2) é obrigatória desde 2008, e essa porcentagem deve aumentar para 5% (B5) em 2013, gerando grande quantidade de glicerol devido ao aumento da produção do biocombustível. Na União Europeia, companhias de produção de biodiesel enfrentam problemas em relação ao excesso de glicerol produzido, já que sua disposição é dispendiosa economicamente, e o seu valor de mercado é baixo. Uma solução a esse entrave é a utilização do glicerol como fonte de carbono em processos biotecnológicos, como a produção de biossurfactantes (Silva et al., 2009).

A síntese de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando glicerol foi descrita por Zhang et al. (2005), que obtiveram 15,4g/L do tensoativo. Já Rahman et al. (2002) relatam uma produção de 1,77g/L, enquanto Silva et al. (2010) alcançaram 3,5g/L de ramnolipídios. Esses resultados confirmam o potencial da utilização do glicerol como fonte de carbono para a produção de biossurfactante.

Benincasa et al. (2010) propõem o emprego de sistemas integrados para a redução dos custos de produção de ramnolipídios. Um exemplo desse sistema seria a combinação de resíduos do processamento de óleos vegetais e da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, borra de óleo e vinhaça. No processo de produção de etanol é gerado 10L de vinhaça para cada litro de produto, constituindo um grande problema ambiental devido ao grande volume que é produzido. O emprego de borra de óleo vegetal é eficiente para a produção de biossurfactante (Nitschke et al., 2005; Nitschke et al., 2010; Lovaglio et al., 2010), entretanto é necessária a adição de água para diluição e grande quantidade de ácido para ajuste de pH, o que pode ser contornado pela vinhaça, que é um resíduo aquoso com pH em torno de 3,5. Nesse sistema integrado obteve-se 6,5g/L de ramnolipídios, além de redução de 94% na demanda química de oxigênio da vinhaça (Benincasa et al., 2010).

Outra fonte renovável e de baixo custo para ser utilizada em processos biotecnológicos é o melaço de cana-de-açúcar. Patel e Desai (1997) utilizaram o melaço associado à água de maceração de milho (AMM) para a produção de biossurfactante, e obteve-se 0,24g/L de ramnolipídios.

A síntese de biossurfactante a partir de resíduos provenientes da produção de bicomcombustíveis pode reduzir os custos da produção e, consequen-

temente, permitir a substituição dos surfactantes químicos por aqueles de origem biológica.

## Biossurfactantes e suas aplicações industriais

Os campos de utilização dos biossurfactantes incluem a agricultura e as indústrias farmacêutica, petrolífera, de alimentos e bebidas, de papel, de metal, de produtos de limpeza, de couro e têxtil. São imensamente aplicados na indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados a formulações de óleos lubrificantes, assim como em biorremediação e dispersão no derramamento de óleo.

O biossurfactante pode ser adicionado ao local onde há contaminação por petróleo e derivados, ou ainda, o microrganismo produtor pode ser inoculado na área impactada. A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI foi capaz de consumir querosene, óleo diesel e petróleo bruto como única fonte de carbono. A mais alta concentração de ramnolipídio – 9,9g/L – foi alcançada com 30% de óleo diesel (PIRÓLLO et al., 2008)

De acordo com Wang e Mulligan (2009), biossurfactantes podem ser úteis na remoção de arsênico de rejeitos da mineração. Outra aplicação é na remoção de cromo (VI) da água e do solo. Ara e Mulligan (2008) relataram que houve retirada de 100% desse metal da água quando se estabeleceram condições físico-químicas ótimas, como: pH 6,0, solução com 2% de ramnolipídios e temperatura de 25°C.

A remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem e a recuperação melhorada de petróleo também fazem parte dessa gama de aplicações. Além da remoção de hidrocarbonetos, os ramnolipídios são efetivos também na remoção de metais, ou mistura de ambos, de locais contaminados (Mulligan, 2005).

Um estudo realizado por Qiuzhuo et al. (2008) comprovou a eficiência dos ramnolipídios na decomposição de palha de arroz, aumentando em 22,3% a produção de açúcares redutores quando se adicionou biossurfactante purificado ao meio de sacarificação hidrolítica. Foi avaliado também o efeito da inoculação de *P. aeruginosa* para a produção *in situ* do tensoativo, e a quantidade de açúcares redutores produzido foi 12,2% maior quando comparado ao controle, lembrando que esse segundo método omite a etapa de purificação, reduzindo os custos do processo.

Os biotensoativos possuem propriedade antiadesiva, que impede a formação de biofilmes patogênicos em materiais hospitalares, diminuindo o risco de infecções hospitalares sem a utilização de drogas sintéticas (Singh e Cameotra, 2004). De acordo com Wei et al. (2005), os biossurfactantes podem atuar na recuperação de adsorventes de óleos usados. Dessa maneira, esse material pode ser reutilizado na recuperação de óleo ou em outras aplicações, como na engenharia civil.

Os biossurfactantes podem atuar, ainda, como antimicrobianos, incluindo atividade antifúngica, antibacteriana e antiviral (Abalos et al., 2001). Wang et al. (2005), verificaram que mistura de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* têm efeito potencial algicida, inibindo o crescimento de *Heterosigma akashiwo*, e quando em altas concentrações apresentam forte atividade lítica.

O interesse na síntese biológica de nanopartículas tem aumentado devido à sua excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade. Os ramnolipídios estão sendo empregados na formação e estabilização de nanopartículas de óxido de níquel e zircônia e prata (Mulligan, 2009; Palanisamy e Raichur, 2009; Ganesh et al., 2010). As nanopartículas de ramnolipídios e prata exibem atividade antibiótica contra patógenos gram-positivos/negativos e leveduras *Candida albicans*, evidenciando o amplo espectro de ação da sua atividade antimicrobiana (Ganesh et al., 2010).

Recentemente, foi descrito por Zhang e Ju (2011) a utilização de ramnolipídios para separação de  $\beta$ -glicosidase de uma mistura de enzimas por meio do fracionamento de espuma. Os ramnolipídios foram utilizados devido à sua propriedade espumante e pela presença de di-ramnose em alguns homólogos, a qual atua como um substrato análogo para a  $\beta$ -glicosidase.

## **Produção de ácido lático a partir de biomassa agroindustrial**

A preocupação com a escassez dos recursos não renováveis, assim como os problemas ambientais relacionadas ao uso de matéria-prima fóssil, como o aquecimento global e ainda a elevação dos preços do petróleo, têm incentivado a busca de alternativas que diminuam o impacto ambiental e reduzam os custos de produção. A utilização da biomassa é uma possibilidade

promissora, especialmente para o Brasil, que produz matéria-prima abundante, diversificada e com preço competitivo.

A conversão da biomassa em produtos de maior valor agregado que possam substituir os derivados de petróleo, por meio da fabricação dos “polímeros verdes”, apresenta um grande potencial ainda pouco explorado. O ácido lático se apresenta como matéria-prima de grande importância para a indústria química, uma vez que pode ser produzido por fermentações bacterianas de substratos renováveis e de baixos custos.

O Brasil se destaca como bastante competitivo na produção de substratos industriais que poderiam ser empregados na fermentação láctica, como o caldo e o melão de cana-de-açúcar, assim como o soro de queijo. Tais substratos não necessitam de uma prévia hidrólise, pois são constituídos de açúcares prontamente metabolisáveis (sacarose, glicose, frutose e lactose), contendo, ainda, outros nutrientes necessários à bactéria.

Embora os resíduos lignocelulósicos agroindustriais necessitem de um tratamento prévio por meio de hidrólise ácida ou enzimática, para disponibilizar os açúcares fermentescíveis, é importante destacar a importância dessas matérias-primas, uma vez que apresentam baixo custo e alta disponibilidade. Dessa forma, alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver tecnologias viáveis, que melhorem o processo de fermentação do ácido lático a partir do bagaço, assim como as fermentações de pentoses a partir de hemicelulose.

## **O ácido lático e o ácido polilático**

O ácido lático é amplamente empregado na indústria têxtil, farmacêutica, química, alimentícia (Wee et al., 2004). O uso do ácido lático na indústria farmacêutica está relacionado à produção de cosméticos. O lactato de cálcio pode ser usado como terapia na deficiência de cálcio. Além disso, pode atuar como um agente de eliminação de cárie dental (Narayanan et al., 2004). Na indústria alimentícia, o ácido lático é empregado como aditivo, acidulante, flavorizante, aromatizante e emulsificante, além de inibir a esporulação de bactérias em alimentos processados, e na indústria química é empregado na produção de solventes orgânicos e na produção de 1,2-propanodiol e ácido acrílico (Hofvendahl e Hahn-Hagerdal, 2000).

O ácido polilático (PLA) tem sido considerado um dos plásticos biodegradáveis mais promissores. A elevada resistência química desse composto é vantajosa para a manufatura de fibras e filmes, enquanto a resistência ao calor é favorável para a produção dos mais diversos utensílios, como copos, bandejas (Tanaka et al., 2006), talheres, pratos, sacolas, sacos de adubo, garrafas de refrigerante e sacolas de supermercado (Naveena et al., 2005).

Os polímeros produzidos a partir de ácido láctico D-(-) e L-(+) têm mostrado propriedades físico-mecânicas comparáveis às dos plásticos produzidos a partir de reservas fósseis de energia, porém com elevadas taxas de biodegradabilidade. Seu tempo de vida útil é curto, podendo ser totalmente degradado no meio ambiente em condições de aerobiose ou anaerobiose (Auras et al., 2003).

Além disso, os polímeros de ácido láctico podem também ser utilizados na medicina, por serem biorreabsorvíveis, podendo ser empregados na regeneração de tecidos, em suturas e em fixações de fraturas (Sakata et al., 2004).

No processo de síntese do PLA, duas moléculas de ácido láctico passam por um processo de esterificação e ciclização catalítica para fazer um éster de dilactídeo cíclico (Figura 21.2). Although dimerization also generates water, it can be separated prior to polymerization due to a significant drop in polarity. Esse processo de dimerização gera água, que pode ser separada antes da polimerização, devido a uma queda significativa na polaridade. PLA of high molecular weight is produced from the dilactate ester by ring-opening polymerization using most commonly a stannous octoate [ citation needed ] catalyst, but for laboratory demonstrations tin(II) chloride is often employed. PLA de alto peso molecular é produzido a partir do éster dilactídeo, pela abertura do anel de polimerização, usando um catalisador (octoato de estanho). Esse mecanismo não gera molécula de água adicional e, portanto, é possível obter uma vasta gama de pesos moleculares (Wikipédia, 2011).

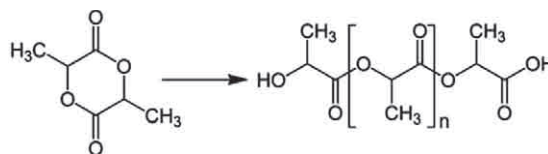


Figura 21.2 – Síntese do poliácido láctico



A pureza enantiomérica do ácido lático é fator crucial nas propriedades físicas do PLA. A polimerização de uma mistura racêmica de L-(+) ou D-(-) ácido lático geralmente leva à síntese de PDLA, que é amorfa. O grau de cristalinidade e muitas outras propriedades importantes são controlados pela razão dos enantiômeros D e L usados (Sodegard e Stolt, 2002). Várias formas distintas de polímeros podem existir: PLLA é o produto resultante da polimerização do L-(+) ácido lático. O PLLA tem uma cristalinidade de aproximadamente 37% e temperatura de fusão entre 173°C e 178°C. A temperatura de fusão do PLLA pode ser aumentada em 50°C, e sua temperatura de deflexão térmica pode ser aumentada em aproximadamente 60°C a até 190°C, pela mistura física com o polímero PDLA, o que pode formar um estereocomplexo altamente regular com cristalinidade aumentada. A estabilidade de temperatura é maximizada quando uma mistura 50:50 é usada, mas mesmo em baixas concentrações, de 3% a 10% de PDLA, ainda há uma melhora substancial. Nesse último caso, o PDLA atua como agente de nucleação, aumentando assim a velocidade de cristalização. Entretanto, devido à maior cristalinidade do PDLA, sua biodegradação é mais lenta do que para o PLA (Wikipédia, 2011).

O ácido lático pode ser obtido tanto pela ação fermentativa de bactérias, fungos e leveduras quanto por síntese química. Porém, os processos fermentativos são mais vantajosos, pois são mais econômicos, não requerem a utilização de temperaturas e pressões elevadas e catalisadores metálicos, o consumo de energia, assim como, o custo da matéria-prima é baixo, é possível utilizar matéria-prima renovável e são “estereosseletivos”, ou seja, produzem um dos isômeros preferencialmente (Pondevy et al., 2001).

Além disso, a síntese química do ácido lático sempre produz uma mistura racêmica. Aproximadamente 90% do total do ácido lático produzido no mundo é produzido por fermentação utilizando bactérias (Zhou et al., 2006).

As bactérias lácticas (BL) são bastante exigentes quanto às condições de crescimento. Segundo Buchta (1983), os açúcares representam as melhores fontes de carbono para essas bactérias, havendo também a necessidade de nitrogênio, vitaminas e sais minerais para o bom desempenho da fermentação láctica. Diversos subprodutos e matérias-primas da agroindústria e da indústria de alimentos têm sido empregados para a produção de ácido lático, pela alta disponibilidade e baixo custo, tais como bagaço, melão e cal-

do de cana-de-açúcar, soro de queijo, além da água de maceração de milho (AMM) e do autolisado de levedura.

Durante a fermentação do açúcar, dependendo da espécie de bactéria, ela pode produzir exclusivamente L-(+) ácido láctico, exclusivamente D-(-) ácido láctico, quantidades aproximadamente iguais de ambos isômeros ou produzir predominantemente uma forma em relação à outra (Garvie, 1980; Kandler e Weiss, 1986; Schleifer, 1986). A maioria das BL produz as duas formas enantioméricas do ácido láctico. A redução enzimática do piruvato a lactato é processada por desidrogenases estereoespecíficas, sendo que o L-(+) lactato é formado pela enzima LdhL, enquanto o D-(-) lactato é formado pela enzima LdhD. Algumas bactérias possuem a lactato racemase (LR), que converte o L-(+) ácido láctico em D-(-) ácido láctico (Kandler, 1983).

O ácido láctico pode ser produzido por bactérias, por algumas leveduras e por alguns fungos filamentosos. Os fungos filamentosos (*Rhizopus*) ainda são pouco utilizados para a produção de ácido láctico, pois o processo necessita de biorreatores, com alta taxa de aeração, pois são obrigatoriamente aeróbios. Além disso, a eficiência dos processos produtivos utilizando esses microrganismos é baixa, devido à menor taxa de reação causada pela limitação à transferência de massa (Park et al., 1998). A produção de ácido láctico é feita principalmente por BL. Os gêneros que compreendem essas bactérias são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, assim como *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Euzeby, 1997).

## Produção de ácido láctico a partir de recursos renováveis

Biomassas agrícolas ou agroindustriais são consideradas fontes renováveis de energia. Por volta de 3,5 milhões de toneladas de resíduos agrícolas são produzidas por ano no mundo. O uso de uma determinada matéria-prima de carboidrato depende de seu preço, sua disponibilidade e sua pureza. Embora os resíduos agroindustriais sejam ricos em carbono, sua utilização é limitada, devido à baixa concentração de proteína (Pondevy et al., 2001).

A fonte de carbono para a produção microbiana de ácido láctico pode ser o açúcar em sua forma pura, como a glicose, sacarose, lactose. Entretanto, esses açúcares são muito caros. Dessa forma, diferentes produtos

alimentícios e agroindustriais ou resíduos são alternativas mais baratas do que açúcares refinados para a produção de ácido lático, tais como soro de queijo (Buyukkileci e Harsa, 2004; De Lima et al., 2010), amido de batata, tapioca, milho, trigo, mandioca, vagem, cevada e cenoura (Rojan et al., 2005; Anuradha et al., 1999; Bulut et al., 2004; Narita et al., 2004; Oh et al., 2005; John et al., 2006), melaço e caldo de cana-de-açúcar (Calabia e Tokiwa, 2007; Coelho et al., 2010; Coelho et al., 2011; De Lima et al., 2009; De Lima et al., 2010), manipueira (Coelho et al., 2010), AMM (Coelho et al., 2010; De Lima et al., 2009), resíduos de papel de escritório (Park et al., 2004), hidrolisados de hemicelulose e lignocelulose (Karel et al., 1997), celulose (Venkatesh, 1997), sorgo doce (Richter e Trager, 1994) e glicerol (Mazumdar et al., 2010). O bagaço de cana é usado como suporte para a produção de ácido lático por *R. oryzae* e *Lactobacillus* em fermentação em estado sólido (SSF) ou hidrolisado de amido como fonte de carbono (Rojan et al., 2005).

Geralmente, BL são deficientes em enzimas celulolíticas e amilolíticas e requerem uma hidrólise prévia dos resíduos celulósicos e amiláceos para sua melhor utilização. Pode ser realizada a hidrólise ácida ou enzimática. A hidrólise da casca de café foi estudada usando ácido diluído ou tratamento a vapor (Pandey e Soccol, 2000) ou por enzimas lignocelulolíticas (Pandey, 1991; Pandey et al., 2000). O material lenhoso pode ser triturado até formar uma polpa de celulose com bissulfato de cálcio para liberar hexoses e pentoses. Esse licor de sulfito de resíduos pode ser utilizado para a fermentação lática pelos microrganismos como *L. pentosus* (Sethi e Maini, 1999). A utilização de ácido ou enzima para hidrolisar resíduos que contenham amido, como bagaço de mandioca, é bem documentada (Woiciechowski et al., 2002). O bagaço pode ser gelatinizado, tratado com alfa-amilase (liquefação) e glucoamilase (sacarificação). Woiciechowski et al. (ibidem) estudaram o aspecto econômico da recuperação de açúcares redutores por hidrólise ácida e enzimática do bagaço de mandioca. Embora tanto a hidrólise ácida como a hidrólise enzimática sejam quase igualmente eficientes, com base no rendimento de açúcares redutores (94,5% de hidrólise ácida e 97,3% da enzima hidrólise), a hidrólise ácida é economicamente mais vantajosa, pois o custo do consumo de energia para a hidrólise enzimática é 24,92% maior do que para a hidrólise ácida (ibidem). Frações de celulose e hemicelulose podem ser gelatinizadas com 72% de ácido sulfúrico e, em seguida, diluí-

das para obter os açúcares (Pandey e Soccol, 2000). Outro resíduo muito importante da indústria de laticínios é o soro de queijo, que contém lactose como fonte de carbono, proteínas, vitaminas e minerais.

O melaço também tem sido muito estudado, por ser um subproduto abundante, pois aproximadamente 17,9 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar são produzidos por ano no Brasil durante a fabricação do açúcar. Além de sua composição rica em açúcares fermentescíveis (Lima et al., 1975), nitrogênio e vitaminas, seu custo é baixo e há alta disponibilidade no território brasileiro.

Entretanto, a maioria dos resultados sobre o ácido láctico produzido (17g/L – 90g/L) e a produtividade (2g/L – 4g/L h) em fermentações em batelada é relativamente baixa (Kotzamanidis et al., 2002). Assim, pode ser necessário o tratamento adicional do melaço com ácido sulfúrico, fosfato tricálcico, ferrocianeto de potássio e EDTA, para aumentar a eficiência na fermentação, porque o melaço contém metais pesados (ferro, zinco, cobre, manganês), além de magnésio e cálcio, que podem inibir o crescimento celular, afetar o pH do meio e inativar as enzimas associadas com a formação do produto (Roukas, 1998).

### **Tendências atuais e perspectivas futuras nas pesquisas com ácido láctico**

O mercado mundial de ácido láctico, praticamente imune à recente turbulência na economia global, está atualmente experimentando um crescimento constante. É observado um aumento da demanda devido ao surgimento de novas aplicações, e espera-se que esse crescimento continue para os próximos anos. Segundo um novo relatório da Global Industry Analysts Inc., o mercado global de ácido láctico irá alcançar 328,9 mil toneladas em 2015.

O ácido láctico é usado em alimentos e bebidas, cosméticos, produtos farmacêuticos, plásticos biodegradáveis e outros setores químicos. O uso de ácido láctico em produtos para cuidados pessoais e farmacêuticos, tais como soluções intravenosas, hidratantes, xampus, cremes antienvelhecimento da pele e sabonetes, continua em alta em diversos países. É previsto que essa demanda pela utilização do ácido láctico aumente ainda mais devido ao apelo mundial pela utilização de biopolímeros em detrimento aos polímeros convencionais, em respeito ao ambiente, e também

devido à reciclagem fácil e de menor custo. Dessa forma, pode-se destacar o PLA como um polímero biodegradável chave. Outra área de destaque, responsável pelo aumento da demanda de produção do ácido lático, seria a dos solventes verdes, que são ésteres de baixo peso molecular derivados do ácido lático, tais como álcoois etílicos, propil, butil e lactato. A Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos da América aprovou os solventes de ésteres de lactato como ingredientes inertes com insignificante toxicidade e um excelente perfil ambiental (Datta e Henry, 2006).

Além disso, o ácido lático pode ser potencialmente utilizado para a fabricação de grande volume de produtos químicos, tais como propilenoglicol, óxido de propileno, ácido acrílico, ésteres acrílicos e outros produtos químicos intermédios (*ibidem*).

Com a crescente demanda de ácido lático e o aumento da preocupação com o impacto ambiental do acúmulo de gesso como um subproduto da produção fermentativa tradicional de ácido lático, maiores esforços para o desenvolvimento de tecnologias alternativas estão sendo feitos. Abordagens de engenharia genética têm sido exploradas para a melhoria das BL (Singh et al., 2006).

Devido aos problemas intrínsecos ao crescimento em condições anaeróbicas e à incapacidade de BL para produzir ácido lático em condições de baixo pH, o grande desafio está em desenvolver BL com tolerância ao pH baixo e à inibição pelo acúmulo do produto, tornando a recuperação do ácido lático mais fácil e resultando em menor acúmulo de gesso. Apesar do considerável esforço pioneiro investido por algumas empresas no desenvolvimento e na comercialização de produtos à base de ácido lático, tecnologias de produção desse composto orgânico precisam ser mais avançadas e colocadas em prática. Além disso, precisam ser economicamente viáveis e ambientalmente corretas.

## **Produção de ciclodextrinas**

### **A enzima ciclodextrina-glicosiltransferase**

Nos dias atuais, a demanda mundial da principal fonte para a produção de energia, o petróleo, está em constante aumento, principalmente para sa-

tisfazer a produção industrial do rápido crescimento econômico de países em desenvolvimento. Essa situação do mercado atual é refletida na expectativa do aumento do preço do petróleo, maior que US\$ 100/barril (r7notícias, 2011). Diante do fato de o petróleo ser uma fonte de energia não renovável, as pesquisas estão se direcionando para as fontes energia alternativas, com matérias-primas renováveis, como a biomassa, a qual é produzida *in natura* ou obtida no ecossistema, como na agricultura.

As enzimas são produtos industriais, e seu mercado mundial movimentado, anualmente, cerca de US\$2 bilhões (Soetaert et al., 2006). As enzimas são usadas em cerca de 2.500 reações diferentes, que estão listadas no *International Union Handbook of Enzyme Nomenclature* (Aguiar, 2001).

As amilases (enzimas) hidrolisam o amido e são amplamente utilizadas na liquefação do amido, em indústrias de papel, farmacêuticas e alimentícias, tendo como principal preocupação industrial sua produção de baixo custo. Uma alternativa para produção enzimática é a utilização de resíduos agroindustriais no processo de fermentação. Esses resíduos representam um dos melhores reservatórios de carbono na natureza. Muitos estudos têm sido realizados para o uso eficaz desses resíduos para uma posterior produção de enzimas em larga escala. Este capítulo apresenta alguns produtos agrícolas explorados para a produção de enzimas.

O amido é um dos polissacarídeos mais encontrados na natureza e nos alimentos. Composto por unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas -1,4- ou -1,6-, apresenta de 15% a 25% de amilose e de 75% a 85% de amilopectina. Para sua quebra em açúcares menores, é necessária a presença de enzimas pertencentes à família das amilases, que representam, no mercado mundial, de 25% a 33% das enzimas produzidas a partir de microrganismos.

As principais aplicações das amilases são na indústria de alimentos (produção de xaropes de glicose, frutose, maltose), na sacarificação de amido, na indústria de detergentes, na indústria têxtil, na indústria farmacêutica e na produção de novos produtos. A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, E.C. 2.4.1.19) é responsável pela formação de moléculas cíclicas, as ciclodextrinas (CD), compostos cíclicos que têm a habilidade de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas hidrofóbicas. As CGTases são conhecidas por catalisar quatro reações diferentes: ciclização, acoplamento, desproporcionamento e hidrólise de amido (Gunnaratne et al., 2007).

As CD, o principal produto da enzima CGTase, são monômeros de glicose (-D-glucopiranosose) unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 (Huang, 2009), maltooligossacarídeos cíclicos que formam complexos de inclusão devido à sua estrutura tronco-cônica (Dodziuk, 2006), que é favorável à formação do complexo CD/molécula hóspede. As  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD são produtos industriais amplamente utilizados (Seon et al., 2009), constituídas por seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente, com diferentes diâmetros internos para acomodar moléculas de diferentes tamanhos, que, portanto, caracterizam sua aplicação.

A formação do complexo de inclusão pode ser afetada pelo tamanho e pela geometria da molécula hóspede (Tian et al., 2009). Assim, o volume presente em 1g de  $\alpha$ -CD é de 0,1mL (Matioli, 2000). A  $\beta$ -CD (8 Å) pode incluir uma molécula de naftaleno, enquanto que a  $\gamma$ -CD (10 Å), duas moléculas de naftaleno (Provenzi et al., 2006).

A formação de complexos de inclusão pode realizar-se em meio aquoso ou sólido. Em meio aquoso, a cavidade interior das CD é ocupada por moléculas de água por meio de uma interação fraca, a interação polar-apolar, o que facilita a inclusão de moléculas menos polares que a água. Para a formação do complexo de inclusão, primeiramente ocorre a aproximação da molécula hóspede à CD, seguido da eliminação de moléculas de água da cavidade, assimilação dessas moléculas de água pela água circundante e a interação da CD e da molécula hóspede.

Os fatores de encapsulação são relevantes na caracterização da aplicação das CD em escala industrial (Aime et al., 2009), sendo relatados por alguns autores (Ribeiro et al., 2007; Haiyee et al., 2009; Gornás et al., 2009) que a inclusão modifica as propriedades indesejáveis das moléculas, aumentando sua estabilidade após sua complexação com a CD, protegendo contra reações e modificando a mobilidade cromatográfica da molécula hóspede.

A inclusão na matriz rígida das CD geralmente proporciona às moléculas inseridas mudança em suas propriedades físico-químicas, como aumento da estabilidade e biocompatibilidade. Devido à possibilidade de formação dos compostos de inclusão, as CD são muito utilizadas em produtos farmacêuticos, alimentícios e agrícolas. Nesses produtos, as CD agem como veículos de solubilização, sendo incorporadas em seu interior substâncias apolares que utilizam a parte exterior polar do tronco para a solubilização em água (Ribeiro et al., 2007; Rawat et al., 2004; Ueno, et al., 1981).

As CD podem ser modificadas pelo método direto, indiscriminadamente, formando uma mistura de produtos que são separados posteriormente por cromatografia ou por um método mais elaborado, com várias etapas, no qual as modificações ocorrem em posições específicas (Croft et al., 1983). Assim, os grupos hidroxilas presentes nas CD, encontrados nas posições dois, três ou seis, são substituídos. A rotação dos grupos dois e três (hidroxilas secundárias) é muito restrita, enquanto que a rotação das hidroxilas da posição seis (primárias) é livre (Ribeiro et al., 2007).

As CD foram modificadas com o objetivo de aumentar a solubilidade de seus complexos, melhorar a associação entre as CD e as moléculas de inclusão e formar sítios específicos (Caira et al., 2007).

No estudo realizado por Britto et al. (2004), CD foram modificadas visando favorecer a formação de ligações intramoleculares de hidrogênio, com o intuito de conferir um caráter mais rígido às estruturas das CD, tornando-as, assim, estáveis, reduzindo a reatividade e a mobilidade molecular.

A grande variedade da formação de complexos de inclusão (Abdel-Shafi et al., 2009) promove efeitos benéficos como a proteção contra a oxidação de lipídios (Haiyee et al., 2009), a redução ou a estabilidade de aromas (Seon et al., 2009), a estabilidade de cores (Provenzi et al., 2006) e vitaminas (Cho, 2006) e o aumento da solubilidade de drogas (Jeulin et al., 2009). Por essas razões, as CD são amplamente utilizadas em indústrias de alimentos, farmacêuticas, de cosméticos e outras.

Na indústria de alimentos, são utilizados na encapsulação de substâncias, promovendo estabilidade de aromas, vitaminas, corantes, gorduras insaturadas etc., estendendo o tempo de prateleira dos produtos (Szente et al., 2004; Astray et al., 2009; Merji et al., 2009). O conselho europeu em 2008 autorizou o uso da  $\alpha$ -CD como um ingrediente alimentar (Commission Decision, 2008).

As CD são utilizadas na indústria de cosméticos e produtos de limpeza encapsulando fragrâncias, promovendo estabilidade físico-química e reduzindo a velocidade da oxidação dos compostos (Centini et al., 2007).

O interesse da encapsulação de medicamentos como a penicilina e amoxicilina pela indústria farmacêutica ocorreu a partir da complexação do princípio ativo  $\beta$ -lactama com CD (Rawat et al., 2004; Namazi et al., 2009), pois este era pouco solúvel em água, quimicamente ou fisicamente instável e apresentava sabor desagradável, o qual era mascarado pelo uso de CD



(Loftsson et al., 2007; Lu et al., 2009; Namazi et al., 2009). As CD ajudam na ruptura de bolsas de lipídeos em células, melhorando o quadro de doenças vasculares (Rodal et al., 1999; Mattern et al., 2009).

Na indústria química, as CD e seus derivados são utilizados como catalisadores em reações químicas, como ocorre na oxidação de compostos, e auxiliando na extração de um componente de uma mistura (Abdel-Shafi et al., 2009; Sasikala et al., 2009).

Na despoluição ambiental, as CD são utilizadas na tentativa de evitar o efeito de substâncias tóxicas contidas no ambiente por meio da formação de complexos não tóxicos, como nos resíduos industriais (Oonnittan et al., 2009). Alguns compostos orgânicos são os maiores poluentes em água, podendo ser tóxicos ou carcinogênicos até em baixas concentrações. Com o aumento da tecnologia de remoção de poluentes orgânicos da água, as CD removem de 47% a 58% de compostos indesejáveis (Salipira et al., 2006).

A habilidade das CD de sequestrar componentes específicos de um meio é uma das mais promissoras características para aplicação industrial, e suas aplicações estão sendo ampliadas.

## **Produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase – utilização de resíduos agroindustriais**

A enzima CGTase, entre outros diversos produtos biológicos utilizados pelas indústrias, é obtida por processos fermentativos. Atualmente, a fermentação de produtos microbianos apresenta importância crescente na economia. Estima-se que mais de trezentas empresas no mundo produzem e comercializam produtos biotecnológicos. As enzimas produzidas a partir os microrganismos têm as vantagens de custo e eficácia, como o tempo de produção e a facilidade para modificação e otimização do processo fermentativo (Blanco et al., 2009).

A ciclodextrina glicosiltransferase é produzida por uma variedade de bactérias, incluindo, em sua maioria, o gênero *Bacillus*: *Bacillus* sp. TS1-1 (Mahat et al., 2004); *Bacillus* sp., subgrupo *alcalophilus* (Freitas et al., 2004); *Bacillus circulans* ATCC 21783 (Vassileva et al., 2003); *Bacillus firmus* (Moriwaki et al., 2007); *Bacillus macerans* (Arya et al., 2006); *Bacillus macorou* (Wang et al., 2006); *Bacillus circulans* DF 9R (Szerman et al., 2007); e *Bacillus lehensis* (Blanco et al., 2011). Além desses, microrganismos de outros gêneros são citados (Avci et al., 2009; Gawand et al., 2001).

Cada microrganismo apresenta características físico-químicas e exigências nutricionais. Assim, as condições de fermentação – como a composição e concentração dos meios de cultura – e fatores ambientais – como temperatura, concentração de oxigênio e pH – influenciam no crescimento do microrganismo e na produção da enzima. A produção em grande escala de enzimas exige baixo custo e eficácia de produção, que estão diretamente relacionados ao aproveitamento de amido como uma matéria-prima industrial para a obtenção de um melhor resultado comercial. Os substratos altamente ricos em energia e que apresentam baixos custos para o processo de fermentação são os resíduos agroindustriais. A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas é objetivo de pesquisadores, devido ao fato de, além de eliminar resíduos ambientais, também produz menos resíduos no caldo fermentativo. Produtos agrícolas como farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de milho, soja, resíduos de mandioca, sorgo, batata, farelo de amendoim e farinha de mandioca podem ser usados como fonte de amido em bioprocessos industriais para a produção de enzima ciclodextrina glicosiltransferase.

## Resíduos agroindustriais

O primeiro estágio da degradação dos resíduos industriais e de matérias-primas de baixo valor comercial é realizado por microrganismos. Existem pesquisas com culturas energéticas para uso em biodigestores. Com a viabilidade do crescimento dessas culturas pretende-se aumentar a produção de açúcar (Murphy e Energia 2008). Polímeros complexos, incluindo carboidratos, proteínas e lipídios, também são digeridos em monômeros por enzimas, celulase, amilase e protease, produzidas por esses microrganismos. O amido, um tipo de carboidrato, é utilizado por uma vasta gama de bactérias para produzir a enzima CGTase. Os produtos secundários menos complexos podem ser utilizados como substrato em novos processos de fermentações.

## Amido

As principais agriculturas de amido do mundo são trigo, arroz, milho, batata, aveia e mandioca. A mandioca (*Manihot esculenta*), também deno-

minada polvilho, segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, 2008), é uma planta da família *Euphorbiaceae*, e dentre as matérias-primas caracterizadas como amiláceas ou feculentas, a mandioca se destaca como excelente opção para fermentações (Daiuto et al., 2002; Blanco et al., 2009) por apresentar alto teor de amido. A mandioca está entre os principais produtos agrícolas do mundo, e o Brasil é um dos maiores produtores mundiais, com mais de dois milhões de hectares para o plantio e com capacidade de expansão em solos menos férteis. Segundo a Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca (Abam), a secretaria de agricultura e abastecimento pretende aumentar a produtividade atual de 23 toneladas por hectare durante um ano para 35 toneladas por hectares durante um ano em cinco anos (Abam, 2009). A água residuária de mandioca é um resíduo de carboidrato gerado em grandes quantidades durante a produção de farinha de mandioca, sendo que uma tonelada de mandioca é gerada a partir de trezentos litros de água residuária de mandioca (Costa et al., 2009). Assim, a mandioca no meio de cultura contribui para uma redução nos custos de produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase (Blanco et al., 2011), aumentando o valor econômico dos resíduos.

## Fontes de nitrogênio

Os produtos de origem animal, vegetal e derivados são comumente usados como fonte de nitrogênio nos processos de fermentação a partir de substratos como melaço, extrato de malte, extrato de carne ou resíduos agroindustriais. São testados segundo a linhagem do microrganismo utilizado no processo de fermentação. A AMM é um subproduto do processo de moagem de milho, rico em minerais, aminoácidos e vitaminas. Fontes alternativas de resíduos industriais estão cada vez mais sendo utilizadas como fonte de nitrogênio em muitos processos de fermentação industrial para a produção de enzimas.

## Dextrana em biorrefinarias

A crescente utilização de polímeros em diversas aplicações forçou o desenvolvimento tecnológico de sua produção proveniente do petróleo. Con-

tudo, devido às altas de preço e à crescente limitação de disponibilidade dessa matéria-prima, tornou-se necessário o desenvolvimento de produção a partir de recursos renováveis por meio das biorrefinarias (Bastos, 2007).

Os biopolímeros, ou “polímeros verdes”, produzidos por ação microbiana, como poliamidas, poliésteres e principalmente os polissacarídeos (ou, como são comumente denominados, “biopolissacarídeos”), têm apresentado promissoras aplicações industriais (ibidem).

Neste tópico daremos ênfase ao biopolímero dextrana, que é um homopolissacarídeo formado por unidades D-glucopiranosil, sintetizadas a partir da ação da enzima dextranasacarase secretada pelas bactérias agrupadas na família *Lactobacillaceae* e, mais especificamente, nos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*. Mas a cepa mais amplamente utilizada em pesquisas e industrialmente é a *Leuconostoc mesenteroides*, e a linhagem que recebe maior atenção e tem sido utilizada para a produção de dextrana comercialmente é a NRRL B512F. (Brown e McAvoy, 1990). As possibilidades de aplicação da dextrana têm se mostrado inesgotáveis desde sua descoberta, e o crescente interesse em investimentos na sua produção e utilização deve-se não somente por se tratar de um produto com características hidrofílicas, pureza e habilidade para formar soluções claras e estáveis, mas por ser um produto originário de fontes renováveis e degradado por sistemas ecológicos.

Como as biorrefinarias processam biomassa utilizando um subproduto proveniente de algum outro processo, maximizando a variedade e a produção de produtos, a dextrana pode ser considerada um produto de biorrefinarias, por sua produção poder ocorrer partir de biomassas, como o melão e a AMM, que são, respectivamente, fonte de carbono e nitrogênio.

## **Processo de produção convencional e produção por via enzimática**

A produção de dextrana pode ocorrer por meio de dois processos distintos, sendo eles o processo convencional e a produção por via enzimática.

No processo convencional de produção de dextrana, esta é produzida durante o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em meio de cultura contendo sacarose (melão), fonte de nitrogênio (extrato de levedura ou AMM) e outros nutrientes, controlando a temperatura, o pH e a aeração.

Na produção de dextrana por via enzimática existem duas etapas: produção da enzima e síntese da dextrana. A síntese da dextrana *in vitro* apre-

senta um potencial econômico enorme, devido a algumas características da enzima. Por ser uma enzima extracelular, para sintetizar a dextrana não é necessária energia adicional, e, além disso, a reação é irreversível. (Kaboli e Reilly, 1980)

Após a produção, a dextrana é precipitada com metanol ou etanol, com eliminação prévia das células. O maior produtor de dextrana é a Pharmacia, seguida por Fisons, Meito, Pfeiffer & Langen, UEB Sermwerke e Polfa. No segmento clínico, além da Pharmacia e da Fisons, são mencionadas a Knoll/Schiwa, a Abbot e a Trevenol (Canilha, 2006).

### **Uso do melão e AMM na produção de dextrana por microrganismos**

Os polissacarídeos obtidos de microrganismos são uma alternativa extremamente válida em diferentes áreas industriais, já que possuem propriedades similares aos sintetizados quimicamente e, em alguns casos, são mais vantajosos por possuírem propriedades específicas que os qualificam para o desenvolvimento de novos produtos.

Os meios de cultivo utilizados na produção de alguns polissacarídeos podem ser complexos ou quimicamente definidos, sendo que os meios complexos podem ser formulados a partir de subprodutos industriais, tais como o melão, cana-de-açúcar, AMM, soro de queijo, manipueira, farinha de trigo, farinha de soja, entre outros.

Essas matérias-primas são de composição química desconhecida, podendo-se conhecer os teores dos açúcares disponíveis, de nitrogênio e de fósforo, mas não se conhecem os teores dos sais minerais, pois certamente há sempre um número muito grande de constituintes. Esses meios podem requerer suplementação com compostos que proporcionem quantidades adicionais de alguns elementos. Nesse sentido, o melão e a AMM apresentam uma composição bastante complexa.

O melão é resultante da etapa de centrifugação ou de decantação no processo de fabricação de açúcar. Além de conter sacarose, apresenta uma grande quantidade de açúcares redutores e um teor relativamente alto de sais. Usualmente, é utilizado na fermentação para a produção de álcool – em especial o etanol –, como matéria-prima para fabricar cachaça, rum e fermentos biológicos e é usado largamente em rações animais.

A AMM (*Corn steep liquor*) é um subproduto rico em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato.

Segundo Schmidell (2001), é sempre difícil mencionar as características de microrganismos sem associá-los a um determinado meio de cultivo. Algumas características importantes dos meios de cultivo são destacadas a seguir:

- ser o mais barato possível;
- atender às necessidades nutricionais dos microrganismos;
- auxiliar no controle do processo, como é o caso de ser ligeiramente tamponado, o que evita as variações drásticas de pH, ou evitar uma excessiva formação de espuma;
- não provocar problemas na recuperação do produto;
- os componentes devem permitir algum tempo de armazenagem, a fim de estarem disponíveis todo o tempo;
- ter composição razoavelmente fixa;
- não causar dificuldades no tratamento final do efluente.

Todas essas características são importantes, destacando-se o custo do meio de cultura, que deve ser o menor possível, desde que atenda às necessidades do microrganismo selecionado.

Diante do exposto, ressalta-se que a utilização de substratos alternativos de baixo custo em processos fermentativos permite a redução dos custos de produção, minimizando problemas ambientais, pois auxilia na destinação desses resíduos.

A sacarose e a glicose são usadas como fonte de carbono preferenciais para a produção de biopolímeros (Sutherland, 2002), porém algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, tais como melão, resíduo da indústria de soja, soro de leite, entre outras (Kalogiannis et al., 2003; Nitschke et al., 2001). O melão é um subproduto do processo de produção de açúcar, tanto o açúcar de beterraba quanto açúcar de cana, sendo definido como um xarope que escoa do estágio final da cristalização do açúcar. É uma das fontes de carbono mais econômicas na indústria microbiana, sendo usado como substrato em fermentações (Bae e Shoda, 2004; Kalogiannis et al., 2003).

Salienta-se que a composição do melão é complexa. Os principais componentes são água e açúcar, e os componentes secundários são oligoelementos, vitaminas e substâncias de crescimento.

Em relação à AMM, a principal desvantagem desse subproduto em microbiologia é a variável composição. Essa variabilidade pode estar rela-

cionada ao tipo e condição do milho, mas ainda mais sobre uma infinidade de variáveis envolvidas no processamento de amido. Por outro lado, esse subproduto é uma alternativa barata em relação a outros, tais como o extrato de levedura e a peptona. A AMM tem um pH de 3,7 a 4,1 geralmente apresenta um teor de nitrogênio de 3,85% a 4,1% e contém quantidades consideráveis de vitaminas do complexo B, com exceção da tiamina, que normalmente é baixa ou ausente.

O uso desse subproduto em meios de cultura data de 1909, tendo contribuído fortemente para a produção da penicilina.

Nos meios de cultura, pode servir tanto como um complemento para substituir extratos quanto como a principal fonte de nitrogênio e carbono para todos os microrganismos, exceto patógenos fastidiosos. Em geral, qualquer organismo capaz de crescer bem em meios simples contendo extrato de carne e peptona vai crescer em meios contendo apenas AMM, como, por exemplo, os seguintes microrganismos: *Acetobacter suboxydana*, *Candida guilliermondi*, *Aspergillus flavus*, *Bacillus macerans*, *Candida lipolytica*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus lactis* e *Aspergillus flavus*.

Alguns autores estudaram a utilização de subprodutos da agroindústria na produção de dextrana.

Moosavi-Nasab et al. (2010), estudaram a produção de dextrana por *Leuconostoc mesenteroides* utilizando resíduos da indústria de alimentos. O objetivo do estudo foi avaliar a produção de dextrana a partir do melaço (um subproduto das refinarias de açúcar) e do soro de queijo (subproduto da indústria de laticínios). Segundo os autores, a máxima produção de dextrana foi obtida quando o microrganismo foi cultivado em meio de cultura contendo soro de queijo e melaço 10% (p/v), sendo viável a utilização desses resíduos na produção de dextrana.

Ribeiro et al. (1998) estudaram a produção de dextranasacarase por fermentação com *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 (F) em diferentes formulações de meio de cultura. A temperatura usada foi 27°C, pH 6,7, aeração 0,5vvm e agitação 250rpm. Dentre os meios utilizados, o que apresentou melhores resultados em termos de produção de enzima foi aquele contendo melaço (40g/L) em substituição à sacarose, atingindo uma atividade de 240UDS/ml após sete horas de fermentação.

Cortezi e Conteiro (2001) observaram que a concentração de melaço no meio de cultivo teve forte influência na produção da enzima dextranasaca-

rased por *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B. Segundo os autores, a maior atividade enzimática foi obtida quando utilizado melão na concentração de 97,3g/L correspondente a 25g/L de sacarose.

A produção de dextranasacarase por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512(F) foi estudada por Queiroz (1987). As fermentações foram realizadas em frascos agitados e minifermentadores em batelada e batelada alimentada. Nesse estudo foram testados meios de cultura contendo melão, AMM, extrato de levedura e sacarose. Na fermentação em frascos agitados, verificou-se uma baixa produção da enzima, não havendo diferenças significativas para os meios com melão ou sacarose pura. Em minifermentadores o controle de pH promoveu um aumento de aproximadamente 60% para o meio padrão e 40% para os meios com melão. Com fermentações em batelada alimentada, a produção de dextranasacarase foi aumentada de três a quatro vezes. Os melhores resultados foram conseguidos em meio padrão, chegando, ao final de dez horas, a 35UDS/ml. Nos meios com melão e AMM, os melhores resultados foram conseguidos com alimentação contínua de melão. Nessas condições, a atividade máxima ficou em torno de 80UDS/ml.

## Aplicações das dextranas

Atualmente a dextrana tem sido empregada em diversas áreas devido às suas características não iônicas e à boa estabilidade em condições normais de operação. O potencial da dextrana se estende à indústria farmacêutica, química, petroquímica e de alimentos. Dentre as aplicações que alcançaram sucesso comercial, destacam-se as utilizações na indústria farmacêutica para fins clínicos. Mais recentemente, a indústria fotográfica e a oftalmológica têm mostrado um grande interesse na demanda de dextrana. Dextranas são também utilizadas em formulações de cremes e loções, obtendo grande sucesso nas formulações de cremes utilizados em bebês.

Outra área em crescimento que faz uso da dextrana e que já foi aprovada pelos Estados Unidos da América e pela Comunidade Europeia é a de imagem de ressonância magnética. Além dessas aplicações, a dextrana também vem sendo usada na biologia molecular, onde um de seus derivados, a dextrana sulfato, é utilizada em processos de hibridização. A dextrana tem contribuído para a estabilidade de vacinas, auxiliando em bioprocessos industriais, visando o melhoramento de técnicas de floculação.



A dextrana de baixa massa molar ( $< 75000\text{Da}$ ), por ser completamente metabolizada pelo organismo e por não apresentar efeitos tóxicos ou alérgicos, pode ser amplamente empregada pela indústria farmacêutica, tendo como exemplo de aplicação de maior importância a utilização como expansor do plasma sanguíneo e o uso do complexo dextrana-ferro no tratamento da anemia.

A indústria alimentícia utiliza a dextrana como agente estabilizante e geleificante, que inibe a cristalização (ibidem).

A título de curiosidade, o polímero de dextrana é o chamado Sephadex (*SEparation, PHarmaciacia DEXtran*), que em 1959 teve suas propriedades filtrantes publicadas na *Nature* (Porath e Flodin, 1959), o que gerou imediata aceitação dos bioquímicos de todo o mundo no uso do gel para purificação de moléculas biológicas, sendo que ainda hoje é usado no estudo de estruturas e na função de biomoléculas, especialmente de proteínas (Pharmaciacia.Biotech, 1997)

Entre os anos 1976 e 2010, somente nos Estados Unidos da América foram patenteados 44.086 estudos sobre dextranas e seus derivados (US Patent, 2010). Na Europa foram registrados 3.926 documentos sobre patentes de dextrana e derivados (EU Patent, 2010).

Existe um número considerável de artigos publicados que relatam os inúmeros usos da dextrana e de seus derivados (Leathers, 2002; Remaud-Simeon et al., 2000; De Belder, 1996), tanto na área alimentícia como na farmacêutica (Pharmaciacia.Biotech, 1997) e química, sendo empregada como agente emulsificante, condutor, estabilizante (Goulas et al., 2004), terapêutico, estabilizante, imunoestimulante ou prebiótico (Eggleston e Cote, 2003), espessante (Naessens et al., 2005; Food, 2000), anticristalizador, melhorador de hidratantes, separador como polímero de ligação cruzada em purificação e separação de proteínas (Leathers, 2002; Robyt, 1985; Sarwat et al., 2008; Pharmaciacia.Biotech, 1997), no tratamento da deficiência do ferro em anemias, auxiliador na técnica de ressonância magnética (De Belder, 1996), anticoagulante similar à heparina (Alsop, 1983), inibidor potencial da ribonuclease, antiviral no tratamento do HIV (Piret et al., 2000; Ueno e Kuno, 1987; James, 1988), como fonte de energia em alimentos, como adoçante (Naessens et al., 2005), entre inúmeras outras aplicações.

O quadro a seguir mostra um resumo de diversas aplicações da dextrana em diferentes áreas.

Quadro 21.1 – Resumo dos usos recentes da dextrana em diferentes áreas

<b>Aplicação</b>	<b>Comentário</b>	<b>Referência</b>	<b>Ano</b>
Biomateriais	Compostos de dextrana oxidada com N-carboxietilquitosana não citotóxicos e hidrogéis.	Weng et al., 2008	2008
Fármacos	Três massas molares diferentes de dextranas como redutor da higroscopicidade de extratos herbáceos amorfos.	Tong et al., 2008	2008
Fármacos	Uso de microesferas de dextranas na imunização contra o tétano.	Tabassi, Tafaghodi e Jaafari, 2008	2008
Medicina	Adição de dextrana sulfato como atenuante de problemas cardíacos.	Banz et al., 2008	2008
Medicina	Dextrana ligada a polietilenoglicol para engenharia de tecidos cartilaginosos.	Jukes et al., 2008	2008
Medicina	Efeito da massa molar da dextrana na agregação de células vermelhas do sangue.	Neu, Wenby e Meiselman, 2008	2008
Medicina	Uso da dextrana como método simples, barato e não reativo para a estimativa de parâmetros do volume sanguíneo em ovelhas prenhas.	Rumball et al., 2008	2008
Medicina	Uso de dextrana como potencial agente veicular de antifúngos.	Choi et al., 2008	2008
Medicina	Uso de dextrana em problemas relacionados com o fígado.	Clay et al., 2008	2008
Medicina	Uso de dextrana sulfato como inibidor da ativação de células naturais assassinas humanas.	Spirig et al., 2008	2008
Medicina	Uso de dextrana sulfato na redução dos danos causados pela isquemia.	Gajanayake et al., 2008	2008
Medicina	Uso de dextrana sulfato no tratamento de doenças ósseas.	Hamdani et al., 2008	2008
Medicine	Uso de dextrana em reações hipersensíveis de resposta a IgG para vacinas.	Zanoni et al., 2008	2008

*Continua*

Quadro 21.1 – Continuação

Aplicação	Comentário	Referência	Ano
Nanotecnologia	Degradação hidrolítica <i>in vitro</i> de fibras de dextranas grafitadas.	Bajgai et al., 2008	2008
Nutrição	Interações entre a beta-lactoglobulina e a dextrana sulfato próximos ao pH neutro e seu efeito na estabilidade térmica.	Vardhanabhat et al., 2008	2008
Medicina	Uso de hidrogéis antioxidantes com potencial uso em produtos cosméticos e farmacêuticos como veículo de vitamina E.	Cassano et al., 2009	2009
Biomateriais	Uso de dextrana na construção de hidrogéis e gelatinas para engenharia de tecidos vasculares.	Liu e Chan-Park, 2009	2009
Nanotecnologia	Nanopartículas biodegradáveis feitas de dextrana grafitada com polilactato.	Nouvel et al., 2009	2009
Nutrição	Presença de dextrana no açúcar brasileiro e em depósitos insolúveis da cachaca.	Aquino e Franco, 2009	2009
Química	Dextrana no clareamento químico de membranas de policarbonados.	Zator et al., 2009	2009
Síntese	Construção de uma enzima fundida de dextranasacarase e dextranase para a produção em um único passo da produção de isomaltoligossacarídeos.	Kim et al., 2009	2009
Medicina	Contração e tempo de efeito da exposição da dextrana em células endoteliais viáveis.	Rouleau, Rossi e Leasky, 2010	2010
Medicina	Conjugado de água, taxol, dextrana e células tumorais pela imobilização de ácido fólico.	Nakamura et al., 2010	2010
Síntese	Hidrogéis de dextrana sintetizados com cloreto de potássio como um ligante cruzado.	Chen, Yi e Zhang, 2010	2010

## Produção de ácido cítrico

Em 2005, o governo brasileiro autorizou o uso comercial do biodiesel, sendo que este era adicionado ao diesel comum a uma proporção de 2% (B2). Em 2008, tornou-se obrigatório o seu uso, e a partir de 2010 a proporção passou a ser de 5% (B5) (Faria et al., 2007; Brasil, 2005). Somente com o uso do B2 foi gerado um mercado de 800 milhões de litros de biodiesel por ano (Almeida e Pinto, 2007), sendo que com a B5, a produção será de 2 milhões de litros por ano (Bulhões, 2007). E com a crescente produção de biocombustíveis, é esperada uma grande disponibilidade de glicerol, pois este é um subproduto abundante da produção do biodiesel. A utilização de óleos vegetais, como o de mamona e de canola, para a produção do biodiesel gera para cada 10kg de biodiesel e 1kg de glicerol (Yazdani e Gonzalez, 2007). Isso significou uma produção atual de 200 milhões de litros de glicerina por ano no Brasil.

A conversão desse glicerol em outras moléculas é um desafio e uma alternativa para reduzir os custos da produção do biodiesel (Papanikolaou et al., 2002). Todavia, novas aplicações estão sendo procuradas para grandes volumes de glicerol, pois este não pode ser utilizado para uso direto em alimentos e cosméticos sem um processo de limpeza e refino (Pachauri e He, 2006).

Sabe-se que o glicerol pode ser utilizado como fonte de carbono em bioprocessos para a fabricação de moléculas de alto valor agregado a partir da fermentação (Almeida e Pinto, 2007). Entre as principais espécies estudadas estão os gêneros *Clostridium*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (Cárdenas et al., 2006; Cheng et al., 2004; Deckwer, 1995; Galdeano-Vilegas et al., 2007; González-Pajuelo et al., 2006; Lee et al., 2001; Pachauri e He, 2006; Solaiman et al., 2006; Yazdani e Gonzales, 2007).

Uma das aplicações estudadas é a do glicerol residual do biodiesel para a produção de 1,3-propanodiol por *Klebsiella pneumoniae*. Vias alternativas para a utilização do glicerol em larga escala estão também sendo estudadas em relação à sua transformação em ácido cítrico e óleo de origem unicelular (Papanikolaou e Aggelis, 2002; Rymowicz et al., 2006).

## Biodiesel

A maior parte de toda a energia consumida no mundo provém de combustíveis fósseis, como o petróleo, o carvão e o gás natural. É quase unânime

na literatura que essas fontes são limitadas e com previsão de esgotamento no futuro. Há uma tendência de crescimento contínuo do consumo a uma taxa média de 3% ao ano no mundo desde 1985. Entretanto, as reservas de petróleo comercialmente exploráveis são descobertas a taxas menores que o consumo. As reservas mundiais de petróleo em 2005 totalizavam 1,147 trilhões de barris, e o consumo anual desse combustível fóssil estava em torno de 80 milhões de barris. Estima-se que as reservas mundiais de petróleo se esgotarão por volta do ano de 2046, isto sem levar em consideração a taxa de crescimento no consumo (Rathman et al., 2005).

A busca por fontes alternativas tem sido objeto de estudo no mundo todo. Nesse contexto, os biocombustíveis surgem como alternativa para substituir os combustíveis derivados do petróleo, e sua demanda vem crescendo rapidamente, sendo a utilização de biomassa para sua produção uma alternativa promissora (Silva, et al., 2009). Além disso, com o advento dos problemas ambientais causados pela queima dos combustíveis fósseis, alternativas com menor impacto ambiental do que as vias tradicionais têm sido pesquisadas (Ferrari, 2005). Estudos já apontam que a utilização da biomassa para fins energéticos vem tendo uma participação crescente em relação à matriz energética mundial, levando à estimativa de que até o ano de 2050 deverá dobrar o uso mundial de biomassa disponível (Fischer, 2001).

O Brasil foi pioneiro no uso de uma fonte combustível limpa (em balanço de  $\text{CO}_2$ ) quando colocou em prática, em 1973, o uso de álcool combustível, sendo que em meados de 1980 a maior parte dos carros fabricados no país foi adaptada para o uso de álcool. Em 2003, cerca de 80% dos carros vendidos no Brasil utilizavam tecnologia flex (capazes de utilizar álcool ou gasolina em qualquer proporção). Na última década a utilização de biocombustíveis aumentou consideravelmente, e em 2003 seu consumo anual foi de aproximadamente 30 bilhões de litros (Demirbas e Balat, 2006). Atualmente, 46% da matriz energética brasileira provêm de fontes renováveis, enquanto que a média mundial é de 13,6%. Certamente a utilização de biocombustíveis tende a aumentar, uma vez que a disponibilidade de combustíveis fósseis é limitada (Silva et al., 2009).

Outro biocombustível promissor é o biodiesel. Assim como o álcool pode substituir a gasolina em motores com ciclo Otto (ou com faísca elétrica), o biodiesel pode substituir o diesel em motores de ignição por compres-

são (ibidem), sendo que o biodiesel tem 85% do poder energético do diesel de petróleo (Cárdenas, 2006).

O biodiesel é um combustível não fóssil formado a partir de alquil-monoésteres derivados da transesterificação de óleos e gorduras. A adição de álcoois de baixa massa molar, como o metanol e o etanol, e de um catalisador ácido ou básico (Ma e Hanna, 1999) resulta na transformação dos triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos. O metanol é o mais utilizado devido ao seu baixo custo e às suas vantagens físico-químicas (polaridade, álcool de cadeia mais curta, reage rapidamente com o triacilglicerídeo e dissolve facilmente o catalisador básico). Já a utilização do álcool etílico necessita que este seja anidro e exige o uso de óleos com baixo teor de água, pois a água no sistema resulta na saponificação dos triglicerídeos (ibidem).

Vários são os benefícios e motivações de caráter ambiental no uso do biodiesel. O biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, permite que seja feito um ciclo fechado de carbono, ou seja, o CO<sub>2</sub> emitido de sua queima é reabsorvido pela cultura de oleaginosas, e ainda pode diminuir em 90% as emissões de fumaça, inclusive as emissões de óxido de enxofre, causador da chuva ácida e de irritações das vias respiratórias (Carvalho, 2006). Além disso, possui características melhores que o diesel comum, como alto número de octano, teor médio de oxigênio, maior ponto de fulgor, menor emissão de partículas HC, CO e CO<sub>2</sub>, caráter não tóxico e biodegradável, além de ser proveniente de fontes renováveis (Faria et al., 2007; Ferrari et al., 2005).

O maior produtor mundial de biodiesel é a União Europeia, com 82% da produção mundial em 2003 (Demirbas e Balat, 2006), sendo que utiliza amplamente esse combustível renovável desde 1991. A Alemanha é a maior produtora e consumidora de biodiesel no mundo, sendo este utilizado em carros de passeio e em veículos de carga e agrícolas (Carvalho, 2006).

Os Estados Unidos da América também incentivam a produção de biodiesel com o “Programa Ecodiesel”, no qual é bastante cogitado o uso da B-20, mistura de 20% de biodiesel ao diesel comum. A política de produção emana da *National Biodiesel Board*, onde uma lei do senado propõe uma meta anual de 20 milhões de litros de biodiesel sendo produzidos. Vários estados americanos incentivam o uso dos estoques de óleo de soja excedentes na produção do biodiesel, sendo que estudos da Comissão de Segurança Ambiental

americana recomendam a utilização do biodiesel em transporte escolar, e a Nasa e as Forças Armadas americanas consideram-no um combustível de excelência para ser usado em qualquer motor diesel. Uma vez que um litro de biodiesel equivale em capacidade energética veicular a 2,5 litros de álcool etílico, o programa americano de biodiesel equivale a sete vezes o máximo atingido do programa brasileiro do álcool (Rathman et al., 2005).

No Brasil, com a crise energética de 1973, o governo brasileiro começou uma série de experimentos na produção de biodiesel, com o programa Prodiesel, em 1979, e o Prosene, a fim de verificar a utilização de biodiesel e querosene vegetal, o que deu origem a duas patentes mundiais. Mas com a queda do preço do petróleo, o preço do combustível estabilizou, e a ideia de biocombustíveis a partir de óleos vegetais foi abandonada no Brasil, as patentes caíram em domínio público devido ao desuso, enquanto que na Europa a ideia prosperou (Parente, 2003).

O biodiesel somente se insere na matriz energética brasileira a partir de 2005, com a criação do marco regulatório, Lei 11.097/2005, que torna facultativo seu uso, em uma mistura de 2% ao diesel comum, a partir da sua publicação. Após 2008, o uso da mistura de 2% se torna obrigatória, e a de 5%, prevista por lei para iniciar em 2013 (Lima, 2007; Rathman et al., 2005), foi antecipada para janeiro de 2010. Atualmente, o Brasil consome cerca de 35 milhões de toneladas por ano de óleo diesel, e com o uso da B2, isto traria uma economia ao país de U\$160 milhões em importação de petróleo. Com o uso da B5, essa economia poderia chegar a U\$400 milhões (Ferreira, 2006). Além disso, o país contém grandes plantações de oleaginosas e, conseqüentemente, pode fazer uso dessa diversidade para a produção de biodiesel a partir de plantas como palma, babaçu, soja, girassol, amendoim, mamona e dendê (Geris et al., 2007; Ferrari, 2005).

O Brasil, com mais de 90 milhões de hectares de terra, que podem ser incorporados ao processo produtivo de maneira sustentável, desponta como o país com as maiores oportunidades com a agricultura de energia. Nos próximos anos, apenas na região do Cerrado, mais de 20 milhões de hectares podem ser disponibilizados para o plantio de grãos, pela integração lavoura-pecuária. No Nordeste, além da cana-de-açúcar, é possível cultivar mamona, amendoim, gergelim, babaçu, entre outras oleaginosas. Somente para a mamona, existe uma área de mais de 4,5 milhões de hectares aptas ao seu cultivo. Segundo a *National Biodiesel Board*, o Brasil teria condições de

ser o líder mundial na produção de biodiesel, podendo substituir em 60% a demanda atual de diesel mineral no mundo (Ferreira, 2006).

Além de fontes oleaginosas cultiváveis para a produção do biodiesel, está sendo investigada a produção de biodiesel de óleo de origem unicelular por algas e leveduras, produzindo biocombustível a partir de biomassa que não compromete fontes de alimentos (Yazdani e Gonzalez, 2007). Outra possibilidade é a utilização de óleo de fritura de restaurantes e lanchonetes. Estima-se que haja um mercado de 30 mil toneladas desse resíduo que podem ser aproveitadas para a fabricação do biodiesel (Parente, 2003).

## Glicerol

O glicerol é conhecido desde 1779, quando foi descoberto por Scheele no processo de saponificação do azeite de oliva. Foi também observado por Pasteur no processo de fermentação etanólica. O glicerol, ou 1,2,3 propanotriol ( $\text{OH-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-OH}$ ), é um poliálcool atóxico, de sabor adocicado, incolor, viscoso, higroscópico, com ponto de fusão a  $17,8^\circ\text{C}$ , ponto de ebulição a  $290^\circ\text{C}$ , solúvel em álcool e éter e insolúvel em hidrocarbonetos. O termo glicerol aplica-se somente ao composto puro, 1,2,3 propanotriol, enquanto o termo glicerina aplica-se à purificação de compostos comerciais que contêm normalmente quantidades maiores ou iguais a 95% de glicerol. É raramente encontrado em sua forma livre na natureza, pois está geralmente associado a ácidos graxos, como o ácido oléico e o palmítico, em óleos e azeites, como o de coco, dendê, soja, algodão e oliva, e também em gorduras de animais, como a banha de porco e o sebo (Arruda et al., 2007).

O glicerol é utilizado amplamente nas indústrias alimentícias, farmacêutica, têxtil, química e de cosméticos. Como exemplo pode-se citar o papel do glicerol na produção de resinas e poliésteres, devido à sua reatividade polifuncional, e também como lubrificante na indústria alimentícia e têxtil (Pachauri e He, 2006).

Outra característica do glicerol é seu papel como osmorregulador, importante mecanismo que ocorre nas células como reação a fatores ambientais (Arruda et al., 2007). Esse mecanismo é utilizado pela levedura *Sacharomyces cerevisiae*, em resposta ao estresse hiperosmótico (redução da água extracelular) (Wang et al., 2001).



O glicerol pode ser produzido por saponificação de óleos e gorduras, assim como a partir de petróleo utilizando cloração em altas temperaturas. Ambas as rotas não são mais utilizadas para a produção em grande escala. Outras vias de produção do glicerol envolvem a fermentação por bactérias, fungos, leveduras, algas ou protozoários, utilizando diferentes substratos, como açúcares, amidos ou celulose. A formação do glicerol dentro da célula ocorre pela redução da dihidroxiacetona, catalizada pela  $\text{NAD}^+$ , a glicerol-3-fosfato, e este é desfosforilado a glicerol (Arruda et al., 2007).

Como subproduto da transesterificação para a fabricação do biodiesel, um triglicerídeo reage com o álcool na presença de uma base ou ácido forte, e produz uma mistura de ésteres de ácidos graxos e glicerol (Geris et al., 2007). A fase mais densa é composta de glicerina bruta, impregnada dos excessos utilizados de álcool, de água e de impurezas inerentes à matéria-prima. A fase menos densa é constituída de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, conforme a natureza do álcool originalmente adotado. O glicerol produzido pode ser retirado por centrifugação (Ma e Hanna, 1999) ou pela adição de água (Hajék et al., 2006). Durante a transesterificação, são produzidos 10% de glicerol (m/m) em proporção ao total de biodiesel produzido (Mu et al., 2006; Papanikolaou et al., 2002).

Entretanto, é economicamente inviável a utilização do glicerol residual do biodiesel na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, uma vez que aquele exige purificação, como branqueamento, desodorização e trocador de íons para remover qualquer traço de outros elementos, tornando o processo oneroso (Pachauri e He, 2006). Alguns processos geram resíduos tão impuros que acabam não sendo aceitos comercialmente. Nesse caso, a glicerina torna-se um efluente da planta, exigindo adequado tratamento, o que demanda investimentos adicionais, com os custos de descarte atribuídos à produção do biodiesel (Ferreira e Cristo, 2006; Yazdani e Gonzalez, 2007).

O aproveitamento do glicerol residual do biodiesel no uso industrial pode tornar a produção do biodiesel competitiva no mercado de combustíveis, reduzindo seu custo de produção (Arruda, 2007). Mesmo assim, a inserção da cadeia produtiva do biodiesel na matriz energética brasileira deverá gerar um aumento significativo da oferta interna de glicerina (Rathman et al., 2005). Também, o preço do glicerol vem se tornando competitivo com o dos açúcares usados na produção de químicos via fermentação microbiana (Dharmadi et al., 2006), e essa fonte de carbono está se

tornando uma promissora e abundante alternativa devido à produção do biodiesel (Silva et al., 2009), sendo que eram estimados cerca de 700 a 900 milhões de toneladas de glicerol disponíveis em 2010 (Vollenweider et al., 2004), e estando o preço do glicerol bruto do biodiesel entre €60 a €80 por tonelada no mercado europeu (Rymowicz et al., 2008). A disponibilidade de glicerol no mercado tem sido tão grande que a Dow Chemical e a Procter & Gamble Chemicals desativaram em 2006 suas plantas de produção de glicerol sintético (Maervoet et al., 2011).

Recentemente novas aplicações do glicerol vêm sendo descobertas, como substrato para fermentações bacterianas com a finalidade de se obter metabólitos de alto valor agregado, como polímeros biodegradáveis, ram-nolipídios, biossurfactantes, entre outros (Arruda, 2007). Apesar de vários microrganismos serem capazes de utilizar o glicerol na presença de acceptor final de elétrons (no caso, o oxigênio), poucos são capazes de fermentá-lo. E para aqueles capazes de fermentar o glicerol em compostos de alto valor agregado existem limitações para sua efetiva manipulação, como a patogenicidade, o requerimento de anaerobiose restrita, a necessidade de suplementação com nutrientes complexos, a falta de capacidade genética e o conhecimento fisiológico do organismo em questão (Yazdani e Gonzalez, 2007).

## **Fermentação do glicerol para a obtenção de produtos de alto valor agregado**

O glicerol começa a ser metabolizado já na membrana celular, dependendo das concentrações e das condições de oxigênio, onde pode ser fosforilado para glicerol-3-fosfato ou catabolizado pela glicerol desidrogenase. Algumas espécies de bactérias apresentam em sua membrana canais facilitadores de glicerol (GlpF) e aquagliceroporinas, que conduzem tanto água quanto glicerol. Os canais facilitadores de glicerol que fazem a fosforilação do glicerol são descritos em *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Nocardia*, *Enterococcus*, *L. lactis* e em espécies de *Pseudomonas*. Sabe-se que o catabolismo de açúcares no sistema respiratório de leveduras é especialmente realizado por ambas as vias pentose-fosfato e Embden-Meyerhof (EMP). Contudo, o catabolismo do glicerol em leveduras é principalmente realizado pela via  $C_3$  da EMP. Em comparação com a utilização de açúcares, isso é visto como uma vantagem, pois apresenta menor rendimento que o

catabolismo de glicerol, uma vez que a via pentose-fosfato leva diretamente à formação de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  (Papanikolaou e Aggelis, 2003).

Com a grande disponibilidade de glicerol e glicerol residual de biodiesel, torna-se interessante sua utilização como fonte de carbono para fermentação. Alguns dos subprodutos que podem ser obtidos a partir de fermentação utilizando o glicerol como fonte de carbono são o 1,3-propanodiol (1,3-PDO) – produzido por algumas espécies de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e pelas espécies *Clostridium butyricum*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae* (Homann et al., 1990) –, o ácido succínico – utilizando *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Yazdani e Gonzalez, 2007; Lee et al., 2001) –, o butanol – pela fermentação por *Clostridium pasteurianum* –, o ácido propiônico – por *Propionibacteria acidipropionici* –, o ácido acético, o ácido láctico, o 1,3-butanodiol (Deckwer, 1995), o dihidroxiacetona, o hidrogênio e os polidroxialcanoatos (Pachauri e He, 2006; Solaiman et al., 2006; Ashby et al., 2005).

A conversão do glicerol para ácido succínico por *Anaerobiospirillum succiniciproducens* também é descrita, e sua produção pode ser obtida junto com a pequena formação de ácido acético. A máxima produção realizada por meio de fermentação alimentada de glicerol e extrato de levedura resultou em uma produção máxima de  $49 \text{g.L}^{-1}$  de ácido (Yazdani e Gonzalez, 2007).

Alguns microorganismos têm a capacidade de produzir metabólitos menos tóxicos, como álcoois e glicóis, para escapar da diminuição progressiva do pH do meio conforme produzem ácidos orgânicos. É o caso de *Clostridium acetobutylicum*, que forma ácido acético e butírico em pH neutro e, logo após a acidificação do meio, passa a produzir acetona e butanol. O mesmo acontece com as bactérias do gênero *Klebsiella*, que são capazes de adaptar a formação de metabólitos segundo o pH do meio, como *Klebsiella pneumoniae*, que a partir da fermentação do glicerol troca a produção de ácido acético pela de 2,3 butanodiol assim que o pH cai para 5,5 (Biebl et al., 1998).

## Produção de ácido cítrico por leveduras utilizando glicerol

Há muitas teorias sobre a síntese de citrato tanto em leveduras como em fungos. No entanto, nenhum dos mecanismos é completamente conhe-

cido. Pode-se dizer que o ácido cítrico acumula-se por uma anormalidade induzida no metabolismo do fungo durante o ciclo do ácido tricarbóxico, ou ciclo de Krebs, que é uma sequência cíclica de reações bioquímicas de ocorrência quase universal na mitocôndria de organismos aeróbicos, e é catalisada por um sistema multienzimático, que aceita o grupo acetil, do acetil-coenzima A, como combustível. Em cada viragem no ciclo, uma molécula de acetil-coenzima A (dois carbonos) se liga a uma molécula de ácido oxalacético (quatro carbonos) para formar o ácido cítrico, de seis átomos de carbono. Esse ácido cítrico é então degradado e recuperado na forma de ácido oxalacético, utilizado no próximo ciclo.

A produção fermentativa de ácido cítrico por leveduras pode ser classificada como uma fermentação do tipo II, porque a produção de ácido cítrico surge de um metabolismo de energia primária, embora seja não associada ao crescimento (Rane e Sims, 1996). A produção de ácido cítrico por fermentação mostra claramente uma fase de crescimento da biomassa, seguida da chamada fase de produção do produto, durante a qual o ácido cítrico acumula. A transição do crescimento da biomassa para a produção de ácido ocorre no final do crescimento exponencial, provocada por condições de limitação de nitrogênio (Crolla e Kennedy, 2004).

Extensivos estudos têm mostrado que três fatores são fundamentais no excesso de metabólitos. Um deles é a rápida absorção de fonte de carbono por difusão simples, pois é um fenômeno meramente físico, não dependente de regulação metabólica do organismo. O segundo é o irrestrito fluxo metabólico por meio da glicólise, produzindo precursores para a síntese de intermediários do ciclo do TCA. E o terceiro é a reoxidação do NADH, resultando em níveis mais baixos de ATP e, portanto, diminuição das reações anabólicas. No entanto, o desregulamentado fluxo metabólico por meio da glicólise é um pré-requisito para a síntese rápida de ácido cítrico (Berovic e Legisa, 2007).

O acúmulo de ácido cítrico é bastante influenciado pelo tipo e pela concentração da fonte de carbono. A presença de carboidratos que podem ser facilmente assimilados e metabolizados pelo microrganismo é determinante na produção de citrato. Diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas para a produção de ácido cítrico por leveduras, entre elas podem ser citados n-parafinas, óleos naturais, ácidos graxos, glicerol, etanol, glicose, sacarose e lactose. Essas fontes de carbono oferecem resultados diferen-

tes, dependendo da variedade de levedura com a qual se está trabalhando. Os melaços são preferidos para a produção do ácido cítrico por fungos e leveduras devido a seu baixo custo e sua grande quantidade de açúcares. Mas outros substratos e resíduos industriais também podem ser utilizados, como óleos vegetais (coco, palma, oliva, soja), n-parafina e o glicerol, sendo que *Yarrowia lipolytica* N-5704 é capaz de fermentá-los (Armiliato, 2004). Ultimamente o glicerol bruto, subproduto do biodiesel, tem sido utilizado para biossíntese de ácido cítrico por *Y. lipolytica* (Levinson et al., 2007; Papanikolaou e Aggeliz, 2003; Rymowicz et al., 2008).

Outros fatores como fonte de nitrogênio e de fósforo têm grande importância na formação do ácido cítrico. Baixos níveis de fosfato têm efeito positivo sobre a produção de ácido cítrico, atuando na atividade enzimática. Por outro lado, o excesso de fosfato estimula o crescimento celular. Com relação ao nitrogênio, fisiologicamente, sais de amônio são preferidos, como a ureia, o sulfato e o nitrato de amônio, assim como a peptona, o extrato de malte e o extrato de levedura. A concentração da fonte de nitrogênio necessária para a síntese de ácido cítrico é de  $0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $0,4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Altas concentrações de nitrogênio levam ao aumento de biomassa e consequente consumo de fonte de carbono, diminuindo a quantidade de ácido cítrico produzido (Soccol et al., 2006). A produção de citrato ocorre apenas na deficiência de nitrogênio do meio de cultura, e dessa forma a ausência de nitrogênio livre no meio aumenta a produção de citrato (Rymowicz et al., 2008), sendo que apenas em caso de fermentação contínua o nitrogênio adicionado ao meio de cultivo será somente para a manutenção da viabilidade celular (Rane e Sims, 1996).

Óleos e gorduras são utilizados na produção de ácido cítrico para controlar a formação de espuma. Além disso, alguns óleos estimulam a produtividade e manutenção dos processos de fermentação, e estes podem também ser utilizados como fonte de carbono, sendo consumidos durante a fermentação, quando é necessário manter o seu nível entre 0,05% e 0,3% (Soccol et al., 2006).

O pH de uma cultura pode mudar em resposta às atividades metabólicas microbianas devido à secreção de ácidos orgânicos, como ácido cítrico. No cultivo de *Aspergillus niger*, por exemplo, o pH pode cair rapidamente para menos de 3,0. A natureza do substrato e a técnica de produção também influenciam a cinética de pH. Dessa forma, o pH inicial deve ser bem defi-

nido e otimizado, dependendo do microrganismo, do substrato e da técnica de produção (ibidem).

Várias leveduras têm a capacidade de produzir ácido cítrico. Todavia, *Yarrowia lipolytica* é capaz de produzir esse ácido utilizando diferentes fontes de carbono. Nessa levedura, a produção de ácidos orgânicos ocorre por meio do ciclo do ácido tricarboxílico, ou ciclo de Krebs, onde a Acetil-CoA reage com o oxaloacetato mediante a citrato sintase para formar o ácido cítrico (Crolla e Kennedy, 2004). Algumas cepas dessa espécie, na limitação de fonte de nitrogênio, podem ter aumentada a produção do ácido cítrico devido à alta produção de citrato sintase (Papanikolaou et al., 2002). Ou seja, interrompida a fase de crescimento celular (trofofase) com a diminuição na concentração de íons  $\text{NH}_4^+$  no meio, ocorre o aumento da produção de citrato sintase, resultando em uma produção excessiva de ácido cítrico (idiofase). Os fatores limitantes do crescimento mais significativos para que isso ocorra são, em primeiro lugar, a falta de nitrogênio, e em segundo, a falta de íons fosfato (Rywińska et al., 2006).

Em meio de cultivo contendo tiamina, observa-se que o ácido cítrico acumulado tem sua excreção facilitada para o meio extracelular. A produção de ácido cítrico está intrinsecamente ligada a concentrações limitantes de macronutrientes (nitrogênio e fósforo) e concentrações ótimas de micronutrientes, como íons de ferro, tiamina, controle de pH e saturação de oxigênio dissolvido. Este último é muito importante, pois a falta de oxigênio pode levar à não produção de ácido cítrico ou produção elevada de ácido isocítrico (Levinson et al., 2007; Armiliato, 2004; I'lchenko et al., 2002; Anastassiadis et al., 2006). Em *Aspergillus niger*, altas concentrações de oxigênio são exigidas para a formação do ácido cítrico, maiores do que as requeridas para o crescimento vegetativo, isso porque as cepas produtoras possuem via respiratória alternativa, constituída por uma oxidase resistente a cianidas, que é requerida para a reoxidação de NADH produzida por via glicolítica.

Desde que a produção de ácido cítrico é um processo aeróbio, o oxigênio ofertado tem um efeito determinante sobre sua produção. O aumento da taxa de aeração conduz a bons rendimentos e reduz o tempo de processo. Uma interrupção da aeração durante a fermentação é bastante prejudicial, pois o fornecimento de oxigênio influencia diretamente na formação do ácido cítrico. A alta demanda de oxigênio é suprida por meio de dispo-

sitivos de aeração e é dependente da viscosidade do caldo de fermentação (Soccol et al., 2006). Oxigênio puro pode ser misturado ao ar bombeado no reator, e comprovadamente aumenta a quantidade e produtividade, mas se mostra economicamente inviável. Além disso, devido à alta taxa de aeração, há uma grande formação de espuma, que deve ser controlada com antiespumantes ou mecanismos de quebra de espuma. Quando o organismo se desenvolve na forma de filamentos, a tensão de oxigênio dissolvido rapidamente cai para menos de 50% do seu valor anterior, mesmo sem o aumento significativo da massa seca (ibidem). Isso é importante no caso de *Yarrowia lipolytica*, por ser uma levedura dimórfica.

Kamzolova et al. (2003) descrevem a *Yarrowia lipolytica* como sendo uma levedura especial devido à sua habilidade de secretar grande quantidade de ácido cítrico, assim como uma grande variedade de ácidos orgânicos pertencentes ao ciclo de Krebs, incluindo o ácido isocítrico. No caso específico da *Y. lipolytica*, em concentrações mais elevadas de oxigênio dissolvido no meio de fermentação há favorecimento de acúmulo de ácido cítrico. Em concentrações de oxigênio dissolvido entre 50% e 60%, observa-se uma concentração de ácido isocítrico maior que a concentração de ácido cítrico. Para níveis de oxigênio dissolvido maiores do que 70%, o acúmulo de ácido cítrico é favorecido, enquanto que a produção de ácido isocítrico não sofre grandes alterações. Porém, a adição de inibidores de aconitase, como íons de cálcio, e a limitação de íons de ferro favorecem o acúmulo de ácido cítrico e uma menor produção de ácido isocítrico (Armiliato, 2004).

Em geral, as leveduras apresentam algumas vantagens em relação aos fungos, como maior tolerância a altas concentrações de substrato, maior taxa de conversão, maior produtividade, e permitem um maior controle do processo, por serem de natureza unicelular (ibidem). O grande problema em se produzir ácido cítrico a partir de leveduras está na formação do ácido isocítrico (Rymowicz et al., 2006) e por não se obter uma produção competitiva como a de *Aspergillus niger* (Soccol et al., 2006). Papanikolaou e Angelis (2002) mostraram que a taxa de conversão do glicerol para citrato na fermentação por *Y. lipolytica* mostra-se maior do que se utilizando açúcares, o que não acontece para o crescimento celular, onde a taxa de crescimento utilizando-se açúcares é maior. Sabe-se que a respiração de leveduras utilizando-se açúcares ocorre por duas vias: pentose-fosfato e Embden-Meyerhof-Pathway (EMP). No caso do glicerol, a oxidação ocor-

re somente pela via  $C_3$  da glicólise da EMP. Por esse motivo, a produção de citrato é mais favorecida usando glicerol, pois leva direto ao piruvato, enquanto que a via pentose-fosfato é direcionada para a produção principalmente de compostos NADPH+.

## Ácido cítrico

O ácido cítrico (**ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico**) é o principal ácido orgânico produzido hoje pela fermentação. A história de ácido cítrico começou em 1784, com W. Scheele, que primeiro isolou o citrato de cálcio do suco de limão, o qual, tratado com ácido sulfúrico, liberava o ácido cítrico na forma livre. Em 1893, Wehmer foi o primeiro que observou a produção de ácido cítrico como subproduto do oxalato de cálcio, fermentado por uma cultura de *Penicillium glaucum* a partir da fermentação de açúcar, o que lhe gerou uma patente. Em 1884, foi construída a primeira planta industrial para produção de ácido cítrico usando sistema de fermentação em estado sólido em bandejas abertas, mas dez anos depois a fábrica fechou devido à fermentação ser considerada longa demais, e contaminações frequentes ocorriam. Zahorsky, em 1913, seguindo as pesquisas para a produção de ácido cítrico, patenteou uma nova cepa, *Aspergillus niger*, sendo que Currie, em 1917, abriu um novo caminho para a fermentação industrial, pois constatou que a cepa crescia bem em baixo pH (entre 2,5 e 3,0), o que impedia o crescimento de outros microrganismos. A partir de 1928, o ácido cítrico recomeçou a ser produzido em escala industrial pela via fermentativa usando melado de beterraba, uma fonte de carbono barato, mas apresentava teor de metais elevado, problema este resolvido em 1938 pela adição de ferrocianeto de potássio como agente quelante (Berovic e Legisa, 2007; Soccol et al., 2006).

Em meados de 1960, começou no Japão a primeira produção de ácido cítrico a partir de levedura do gênero *Candida*, que utilizava n-alcanos como fonte de carbono, resultando em quantidades consideráveis de ácido cítrico e isocítrico (Tanaka et al., 1968).

Hoje, praticamente 99% da produção mundial de ácido cítrico é realizada via fermentação de vários substratos por diferentes microrganismos. Sua extração a partir de restos de frutas cítricas ainda é praticada, entretanto, torna-se insignificante quando comparada ao processo fermentativo.



A produção mundial de ácido cítrico atingiu 1,4 milhão de toneladas em 2004, e estimava-se um aumento de 3,5% a 4% por ano, podendo alcançar 1,6 milhão de toneladas em 2010 (Gráfico 21.4), com um preço de mercado chegando a US\$1,3 por quilograma (Rymowicz et al., 2008). Com isso, espera-se que o mercado de ácido cítrico possa ultrapassar os US\$2 bilhões (Soccol et al., 2006).

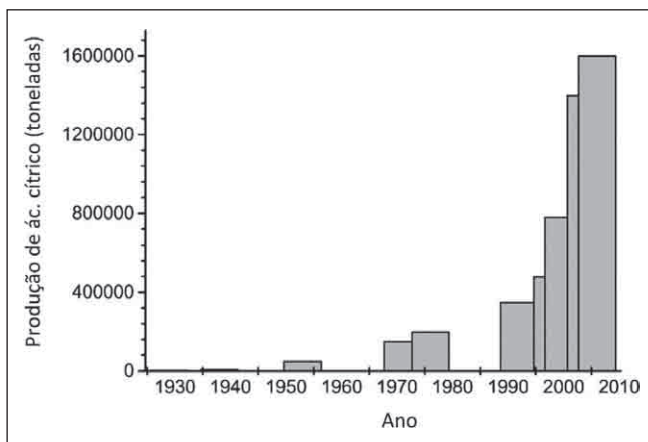


Gráfico 21.1 – Produção de ácido cítrico mundial

Fonte: adaptado de Berovic e Legisa, 2007

Cerca de 60% a 70% do ácido cítrico produzido são consumidos pela indústria de alimentos. Do restante, 18% são utilizados na indústria farmacêutica. Nos maiores produtores – China, Estados Unidos da América e Europa –, quase toda a produção é feita por via microbiológica (Berovic e Legisa, 2007). A China sozinha é responsável por cerca de 40% da produção mundial. Entre as maiores produtoras podem-se citar a ADM, a Cargill, a Tate & Lile, a DSM, a Gadot Biochemical Industries (Israel) e a Anhui BBCa Biochemical (China). A intensa competição e os preços relativamente baixos do ácido cítrico levaram pequenas produtoras a abandonar as linhas de produção de citrato na última década. Isso porque a indústria de ácido cítrico tem passado por muita pressão e oscilação de preços nos últimos anos, com preços do quilo do citrato entre US\$0,70 e US\$2, sendo os fornecedores chineses os mais competitivos, vendendo ao preço mais barato possível para vencer a concorrência europeia (Soccol et al., 2006).

No Brasil, o consumo anual de ácido cítrico e citrato de sódio compreende cerca de 30 mil toneladas por ano. O fato de o ácido cítrico ser muito apreciado na indústria de alimentos deve-se à sua baixa toxicidade, solubilidade, palatabilidade e por ser facilmente metabolizado pelo organismo. Também é utilizado para a limpeza de equipamentos na indústria e, juntamente com seus sais, como tampão e estabilizante em vários produtos alimentícios (Armiliato, 2004; Rymowicz et al., 2008; Berovic e Legisa, 2007). A produção mundial de ácido cítrico ocorre principalmente por meio de fermentação microbiana, sendo que é o segundo metabólito em volume mais produzido, perdendo apenas para o etanol. Enquanto a maior parte da produção do citrato por via fermentativa é realizada pelo fungo filamentososo *Aspergillus niger*, várias leveduras são capazes de sintetizar o ácido tricarbólico, a maior parte do gênero *Candida*, como *Candida tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. intermedia*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *C. fibriae*, *C. subtropicalis* e *C. oleophila* (Berovic e Legisa, 2007). *Yarrowia lipolytica*, em especial, é capaz de fazê-lo em grandes quantidades (Levinson et al., 2007). *Yarrowia lipolytica* tem sido a mais estudada na produção de ácido cítrico a partir de vários substratos oxidáveis à Acetil-CoA, como açúcares, alcanos, óleos vegetais, hidrolisados de amido, etanol e glicerol. A levedura *Yarrowia lipolytica* é uma daquelas com potencial para a produção também de grandes quantidades de ácido isocítrico e de outros ácidos orgânicos que podem servir na síntese mais fácil de outras moléculas na chamada “química verde” (Heretsch, 2008; Sauer, 2008). Além disso, o isocitrato também é matéria-prima para a fabricação de medicamentos para trombose e anemia. Também o  $\alpha$ -cetoglutarato, outro metabólito sintetizado por *Yarrowia lipolytica* em grande quantidade, é fonte de matéria-prima para a fabricação de fármacos, poliésteres, polióis, poliamidas, plastificantes e inibidores de corrosão (Finogenova et al., 2005).

### **Produção de citrato por *Yarrowia lipolytica***

A razão entre nitrogênio e fonte de carbono afeta diretamente a produção de citrato e isocitrato, quando a otimização do meio de cultura pode levar a razões de citrato/isocitrato bastante elevadas (Levinson et al., 2007). De acordo com Costa (2000) e Papanikolaou e Aggelis (2003), a fermentação de ácido cítrico por *Y. lipolytica* ocorre melhor em duas etapas, uma

fase de crescimento celular, e outra de produção de citrato, após a depleção do nitrogênio extracelular. Papanikolaou e Angelis (ibidem) determinaram os modelos cinéticos de *Y. lipolytica* para o crescimento celular, consumo de glicerol e produção de citrato usando frascos comuns em batelada e uma concentração de glicerol inicial de  $80\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e nitrogênio total de  $0,14\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A constante de saturação de nitrogênio obtida foi maior do que a constante de saturação de elementos minerais, que é de  $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , o que pode ser atribuído ao fato de que o crescimento dessa espécie geralmente continua mesmo após a depleção do nitrogênio mineral extracelular, enquanto que as reservas de nitrogênio intracelular são consumidas. Levinson et al. (2007) utilizaram  $40\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicerol e variaram a relação de C/N para observar a produção de citrato e isocitrato. Os resultados sugeriram que uma razão de C/N entre 343 e 686 oferece uma maior produção de citrato, além de favorecer uma melhor relação citrato/isocitrato, maior que 9,0, e que a taxa de conversão é diminuída em razões C/N maiores que 172.

Ribeiro et al. (2009), utilizando *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, realizaram dois planejamentos experimentais 2k-1, variando as concentrações de carbono e nitrogênio. O meio mineral era composto de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ . No primeiro planejamento ( $k = 4$ ), utilizaram duas concentrações de glicerol em  $40\text{g/L}$  e  $200\text{g/L}$ , extrato de levedura na concentração de  $0,5\text{g/L}$  e  $10\text{g/L}$ , sulfato de amônia na concentração de  $0\text{g/L}$  e  $10\text{g/L}$  e agitação a  $160\text{rpm}$  e  $250\text{rpm}$ . Encontraram o melhor resultado ( $0,55\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de citrato) utilizando concentrações de  $200\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicerol,  $0,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura, sem adição de sulfato de amônia, e agitação de  $250\text{rpm}$ . No segundo planejamento ( $k = 2$ ) variaram o glicerol em  $150\text{g/L}$  e  $250\text{g/L}$  e o extrato de levedura na concentração de  $0,1\text{g/L}$  e  $0,9\text{g/L}$  e obtiveram os melhores resultados (custo-benefício) em 45 horas de processo usando  $150\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicerol e fonte de nitrogênio limitante.

Rymowicz et al. (2006), visando a síntese de citrato, utilizaram em seus experimentos frascos de  $300\text{mL}$  com um volume de trabalho de  $50\text{mL}$ ,  $30^\circ\text{C}$  durante 72 horas de fase de produção, adicionado de  $200\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicerol,  $3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $0,2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura, e selecionaram a melhor cepa produtora *Yarrowia lipolytica* 1.31. Em fermentador, fixaram a taxa de aeração em  $0,2\text{min}^{-1}$ ,

600rpm de agitação, pH 5,5 controlado com NaOH, e atingiram um máximo de  $124,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de citrato produzido pela cepa 1.31, equivalente a uma produtividade de  $0,62\text{g/g}$ .

## Produção microbiana de 1,3-propanodiol

O maior destaque está na produção microbiana de 1,3-propanodiol (1,3PDO). O 1,3PDO é conhecido há mais de cem anos e é amplamente empregado na produção de polímeros do tipo polítrimetilenotereftalato (PTT). O PTT é conhecido por suas propriedades elásticas e é empregado amplamente na fabricação de resinas, adesivos, tintas aquosas, laminados, revestimentos, molduras, poliésteres alifáticos e anticongelantes. O 1,3PDO é conhecido por ser uma molécula bifuncional e pode ser usado em mesmas aplicações tais como são usados o etilenoglicol, o propilenoglicol, o 1,3-butanodiol e o 1,4-butanodiol. Além disso, como os passos de produção de polietileno (PET) e PTT são análogos, é possível converter plantas industriais de PET já existentes para a produção de PTT a um custo de cerca de 10% a 20% da construção de uma nova planta. O PTT apresenta a mesma resistência que o PET, com a vantagem de ter uma cristalização mais rápida, menor ponto de fusão e menor temperatura para moldagem (Maervoet et al., 2011).

Existem vários estudos com *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum* e *C. acetobutlicum*, que são capazes de converter o glicerol residual do biodiesel em 1,3PD. Dentre essas bactérias se destaca a *C. butyricum*, que também é capaz de produzir dihidroxiacetona, etanol, acetato e butirato. A ampla variedade de aplicações do 1,3PD permite estimar que em 2020 exista um mercado potencial de 230 mil toneladas por ano (Cárdenas et al., 2006).

A produção do 1,3-propanodiol está ligada a um processo oxidativo do glicerol. O glicerol entra na célula por transportador facilitado de glicerol GlpF ou por difusão (Maervoet et al., 2011). Quando entra na célula, pode seguir por duas vias. Na primeira, oxidativa, sofre desidrogenação pela (co-enzima) NAD ligada a uma glicerol desidrogenase (glyDH), tornando-se uma dihidroxiacetona (DHA), sendo fosforilada por DHA quinases dependente de ATP. Por meio do processo paralelo, via fermentativa, o glicerol

é desidratado pela coenzima B12-dependente de glicerol desidratase, para formar 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA). O 3-HPA então é reduzido para 1,3PD pela NADH ligada ao 1,3PDO desidrogenase (Yazdani e Gonzalez, 2007).

Em *K. pneumoniae*, a taxa de reação global da via redutora é limitada, em primeiro lugar porque essa reação é mediada por uma coenzima, a cianocobalamina (vitamina B12). Além disso, pode haver inibição pelo substrato, formando uma ligação irreversível da ligação Co-C da cobalamina com a apoenzima, formando alquilcobalaminas. Contudo, fatores de reativação, complexo de proteínas GdrA e GdrB, fazem troca da cobalamina inativada por uma nova vitamina B12, na presença de  $Mg^{+}$  e com consumo de Atp. Então, para evitar a baixa atividade da enzima, deve haver o controle da quantidade de glicerol e adição de vitamina B12 ao meio (Shibata et al., 2002; Kajiura et al., 2001; Daniel et al., 1999).

## Engenharia metabólica aplicada à produção de 1,3-propanodiol

Com o uso da engenharia metabólica é possível manipular as vias de síntese de certos produtos e reduzir ou até eliminar a formação de subprodutos indesejáveis (Cheng, Lin e Lin, 2005). Forage e Lin (1982) verificaram os genes responsáveis pela produção de 1,3-propanodiol em *Klebsiella pneumoniae*. Com isso, identificaram o complexo de genes responsáveis pela via da dihidroxiacetona (DHA), que codificam enzimas no metabolismo do glicerol, como glicerol desidratase (DHA 1, 2, 3), 1,3-propanodiol oxireductase (DHA T), glicerol desidrogenase (DHA D), dihidroxiacetona quinase (DHA K) e um gene regulatório (DHA R).

A DuPont e a Genencor International, Inc. modificaram *E. coli* geneticamente de modo que esse organismo pudesse produzir 1,3PDO a partir de glicose. Uma vez que *E. coli* selvagem não pode produzir de forma eficiente glicerol a partir da glicose e não é capaz de produzir 1,3PDO a partir de glicerol, sete genes tiveram que ser introduzidos no genoma. Dois desses genes (*dar1* e *gpp2*) originados de *Saccharomyces cerevisiae*, e cinco genes (*dhaB1*, *dhaB2*, *dhaB3*, *dhaBX* e *orfX*) a partir de *Klebsiella pneumoniae*. Dessa forma, fornece 1,3-propanodiol a uma produtividade de 3,5g/L/h, uma concentração de 135g/L e um rendimento de 0,62mol/mol.

Devido à necessidade de valorizar o glicerol e pelo fato de *E. coli* ter bom crescimento em glicerol, pesquisadores vêm tentando desenvolver *E. coli* para produzir 1,3-PDO. Ma et al. (2009) inseriram dois genes em *E. coli* e, expressando os dois genes na mesma direção, conseguiram produzir 11,3g/L de 1,3PDO a partir de 40g/L de glicerol. Zhang et al. (2006) construíram um plasmídeo similar em *E. coli*, e usando delineamento experimental, a partir de concentrações fixadas em 61,8g/L de glicerol, 6,2g/L de extrato de levedura e 49mg/L de vitamina B12, conseguiram uma produção de 41,3g/L de 1,3PDO. Zhang et al. (2006) conseguiram o máximo obtido com um mutante de *E. coli* quando usaram os genes *dhaB1* e *dhaB2* de *C. buyiricum*, que apresenta rápida conversão e não é dependente de vitamina B12, e usaram fermentação em dois estágios, o primeiro a 30°C, para obtenção de alta densidade celular (*high cell density*), e o segundo passando a cultura para 42°C e anaerobiose total para produção, chegando ao final com 104g/L de 1,3PDO a uma produtividade de 2,61g/L/h.

## Referências bibliográficas

- ABALOS, A. et al. *Langmuir*, [s.l.], v.17, p.1367-71, 2001.
- ABAM. *Mandioca: a raiz do sucesso*. Disponível em: <[http://www.abam.com.br/revista/revista5/raiz\\_sucesso.php](http://www.abam.com.br/revista/revista5/raiz_sucesso.php)>. Acesso em: 25 mar. 2009
- ABDEL-MAWGOUD, A. M. et al. Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation and Bioengineering of Production: In: GLÓRIA, S.-C. Glória (Ed.) *Biosurfactants from Genes to Application*. 1.ed. [s.l.]: [s.n.], 2011, p.13-55.
- ABDEL-SHAFI, A. A.; Al-SHIHRY, S. S. Fluorescence Enhancement of 1-naphthol-5-sulfonate by Forming Inclusion Complex with  $\beta$ -cyclodextrin in Aqueous Solution. In: *Spectrochim*, [s.l.], Acta A., v.72, p.533-7, 2009.
- ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. *Biotechnol*, Letters, [s.l.], v.22, p.313-316, 2000.
- AGUIAR, C. L. Ciclodextrina glicosiltransferase, produção, ação e aplicação. In: *CE-PPA*, [s.l.], v.19, p.119-38, 2001.
- AHRENS, K. et al. Kinetic, Dynamic, and Pathway Studies of Glycerol Metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in Anaerobic Continuous Culture: III. Enzymes and Fluxes of Glycerol Dissimilation and 1,3-Propanediol Formation. *Biotechnology and Bioengineering*, [s.l.], v.59, n.5, p.544-52, 1998.
- AIME, S. et al. New Cyclodextrin Dimers and Trimers Capable of Forming Supramolecular Adducts with Shape-Specific Ligands. *Org. Biomol. Chem.*, [s.l.], v.7, p.370-9, 2009.

- ALCANTARILLA, E. C. *Microorganismos responsables de alteraciones en alimentos altamente azucarados*. Madrid, 1999. Tese (Doutorado) – Universidade Complutense de Madrid. Disponível em: <[www.ucm.es/BUCM/tesis/19972000/X/3/X3049601.pdf](http://www.ucm.es/BUCM/tesis/19972000/X/3/X3049601.pdf)>. Acesso em: 25 fev. 2008.
- ALMEIDA, M. M. T.; PINTO, G. A. S. *Utilização do glicerol para a produção de biomassa por fermentação submersa de Rhodoturula glutinis*. VII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, UFSCar, São Carlos, 2007. Disponível em: <[http://www.ufscar.br/cobeqic07/pdf/poster\\_iii/piii40.pdf](http://www.ufscar.br/cobeqic07/pdf/poster_iii/piii40.pdf)>. Acesso em 25 fev. 2008.
- ALSOP, R. M. Industrial Production of Dextrans. In: BUSHHELL, M. E. *Microbial Polysaccharides*. Amsterdam: Elsevier, 1983, p.1-44.
- ANASTASSIADIS, S.; REHM, H. J. Citric Acid Production from Glucose by Yeast *Candida oleophila* ATCC20177 under Batch, Continuous and Repeated Batch Cultivation. *Electronic Journal of Biotechnology*, [s.l.], v.9, n.1, 2006.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, New York, v.54, p.450-72, 1990.
- ANONYMOUS. *Feedstock Change is Hot and Poppin*, *Chemical Processing*. Jan. 2006, p.22-26.
- ANTONUCCI, S. et al. Selectivity in Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.28, p.189-95, 2001.
- ANURADHA, R.; SURESH, A. K.; VENKATESH, K. V. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Starch to Lactic Acid. *Proc. Biochem.*, [s.l.], v.35, p.367-75, 1999.
- AQUINO, F. W. B.; FRANCO, D. W. Molecular Mass Distribution of Dextran in Brazilian Sugar and Insoluble Deposits of Cachaça. *Food Chemistry*, [s.l.], v.114, p.1391-5, 2009.
- ARA, I.; MULLIGAN, C. N. 61. St Canadian Geotechnical Conference, Edmonton, sept. 2008, p.20-4.
- ARANTES, J. K.; ARMILIATO, L.; RODRIGUES, M. I. *Efeito da agitação e da aeração na produção de ácido cítrico por Candida lipolytica y 1095*. IX Congresso interno de iniciação científica da Unicamp. 2001.
- ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. P. *Appl. Environ. Microbiol.*, [s.l.], v.45, p.162-8, 1996.
- ARMILIATO, L. *Produção de ácido cítrico por Candida lipolytica NRRL-Y1095*. Campinas, 2004. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
- ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Revista Analytica*, [s.l.], n.26, 2007. Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm>>. Acesso em: 25 fev. 2008.
- ARYA, S. K.; SRIVASTAVA, S. K. Kinetics of Immobilized Cyclodextrin Gluconotransferase Produced by *Bacillus macerans* ATCC 8244. *Enzyme Microb. Tech.*, [s.l.], v.39, p.507-10, 2006.

- ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y.; FOGLIA, T. A. Bacterial Poly (hydroxyalkanoate) Polymer Production from the Biodiesel Co-Product Stream. *J. Pol. Environ.*, [s.l.], v.12, p.105-12, 2004.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Synthesis of Short-/Medium-Chain-Length Poly (hydroxyalkanoate) Blends by Mixed Culture Fermentation of Glycerol. *Biomacromolecules*, Washington, v.6, p.2106-12, 2005.
- ASTRAY, G. et al. *A Review on the Use of Cyclodextrins in Foods*. [s.l.]: Food Hydrocolloid., 2009. (no prelo)
- AURAS, R. A.; HARTE, B.; SELKE, S. *Poly (lactide): Moisture Sorption Characteristics and Storage Consequences*. ANTEC 2003 THE 61 ST Annual Technical Conference of the Society of Plastics Engineers, n.61, p.4-8, 2003.
- AVCI, A.; DONMEZ, S. A Novel Thermophilic Anaerobic Bacteria Producing Cyclodextrin Glycosyltransferase. *Process Biochem.*, [s.l.], 2009.
- BAE, S.; SHODA, M. Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses Medium. *Biotechnology Progress*, New York, v.20, p.1366-71, 2004.
- BAJGAI, M. P. et al. In Vitro Hydrolytic Degradation of Poly (E-caprolactone) Grafted Dextran Fibers and Films. *Polymer Degradation and Stability*, [s.l.], v.93, p.2172-9, 2008.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, [s.l.], v.53, p.495-508, 2000.
- BANZ, Y. et al. Addition of Dextran Sulfate to Blood Cardioplegia Attenuates Reperfusion Injury in a Porcine Model of Cardiopulmonary Bypass. *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, [s.l.], v.34, p.653-60, 2008.
- BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A. Propionic Acid Fermentation from Glycerol: Comparison with Conventional Substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v.47, n.4, p.441-6, 1997.
- BASTOS, V. D. Biopolímeros e polímeros de matérias-primas renováveis alternativos aos petroquímicos. *Revista do BNDES*, [s.l.], v.14, p.201-34, 2007.
- BENINCASA, M. et al. Rhamnolipids Surfactants: Alternative Substrates, New Strategies. In: RAMKRISHNA, S. (ed.). *Biosurfactants*. [s.l.]: Springer, 2010.
- BEROVIC, M.; LEGISA, M. Citric acid production. *Biotechnology Annual Review*, [s.l.], v.13, p.303-43, 2007.
- BIEBL, H. et al. Fermentation of Glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v.50, p.24-9, 1998.
- BLANCO, K. C. et al. *Bacillus lehensis*-an Alkali-Tolerant Bacterium Isolated from Cassava Starch Wastewater: Optimization of Parameters for Cyclodextrin Glycosyltransferase Production. *Annals of Microbiology*, [s.l.], v.61, 2011.
- \_\_\_\_\_. et al. Cyclodextrin Glicosyltransferase Production by *Bacillus* sp. Subgroup *alcalophilus* Using a Central Composite Design. *Res. J. Microbiol*, [s.l.], v.4, p.450-9, 2009.



- BRASIL. Lei 11.097 de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. DOU de 14 de janeiro de 2005.
- BRITTO, M. A. F. O.; NASCIMENTO JR., C. S.; SANTOS H. F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. *Quim. Nova*, [s.l.], v.27, p.882-8, 2004.
- BROWN, D. E.; MCAVOY, A. A pH Controlled Fed-Batch Process for Dextranucrase Production. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, [s.l.], v.48, p.405-14, 1990.
- BUCHTA, K. Lactic Acid. In: RHEM, H. J.; REED, G. (eds.). *Biotechnology. Volume 3. Biomass, Microorganisms for Special Applications, Microbial Products I, Energy from Renewable Resources*. [s.l.], V.C.H., Weinheim, 1983, p.409-17.
- BULHÕES, R. *O biodiesel e sua relação com a incorporação de novas áreas e produção de soja no Paraná*. Encontro de Economia Paranaense, V. Curitiba, PR. Brasil, 2007. Disponível em: <[http://www.ecopar.ufpr.br/artigos/a4\\_070.pdf](http://www.ecopar.ufpr.br/artigos/a4_070.pdf)>. Acesso em: 28 fev. 2010.
- BULUT, S.; ELIBOL, M.; OZER, D. Effect of Different Carbon Sources on L(+)-Lactic Acid Production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, [s.l.], v.21, p.33-7, 2004.
- BUYUKKILECI, A. O.; HARSA, S. Batch Production of L(+) Lactic Acid from Whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, [s.l.], v.79, p.1036-40, 2004.
- CABELLO, C.; LEONEL, M. P. Produção de ácido cítrico a partir de manipueira. In: CEREDA, M. P. *Resíduos da industrialização da mandioca*. São Paulo: Pauliceia, 1994, p.109-18.
- CAIRA, M. R. et al. Effect of Peracetylation on the Conformation of  $\gamma$ -Cyclodextrin. *Chem. Commun.*, [S.l.], p.1221-3, 2007.
- CALABIA, B. P.; TOKIWA, Y. Production of D-Lactic Acid from Sugarcane Molasses, Sugarcane Juice and Sugar Beet Juice by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnol. Lett.*, [s.l.], v.29, p.1329-32, 2007.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, [s.l.], v.50, p.520-9, 1998.
- CANILHA, L. Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo. Lorena, 2006. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena.
- CÁRDENAS, P. et al. Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium sp.* mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiésel. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, [s.l.], v.35, p.120-37, 2006.
- CARVALHO, G. D. A indústria dos hidrocarbonetos no Brasil: o problema com o caso gasoduto Bolívia- Brasil e a solução com os combustíveis renováveis. *Papel Político Bogotá*, Colombia, v.11, p.739-60, 2006.
- CASSANO, R. et al. A Novel Dextran Hydrogel Linking Trans-Ferulic Acid for the Stabilization and Transdermal Delivery of Vitamin E. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, [S.l.], v.72, p.232-8, 2009.

- CAVALHEIRO, J. M. B. T. et al. Poly(3-hydroxybutyrate) Production by *Cupriavidus necator* Using Waste Glycerol. *Process Biochemistry*, [s.l.], v.44, p.509-15, 2009.
- CENTINI, M. et al. Cyclodextrins as Cosmetic Delivery Systems. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, [s.l.], v.57, p.109-12, 2007.
- CHANG, J. S. et al. *Syst. and Appl. Microbiol.*, [s.l.], v.28, n.2, p.137-44, 2005.
- CHANPRATEED, S. Current Trends Biodegradable Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, [s.l.], v.110, p.621-32, 2010.
- CHAYABUTRA, C.; WU, J.; JU, L. K. *Biotechnol. Bioeng.*, [s.l.], v.72, p.25-33, 2001.
- CHEN, G. Q. Production and Application of Microbial Polyhydroxyalkanoates. In: CHIELLINI, E.; SOLARO, R. *Biodegradable Polymers and Plastics*. London: Springer, 2003, p.155-66.
- CHEN, J.; YI, J. Z.; ZHANG, L. M. Water in Dextran Hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, [s.l.], v.117, p.1631-7, 2010.
- CHENG, K. et al. 1,3-Propanediol Production by *Klebsiella pneumoniae* under Different Aeration Strategies. *Biotechnology Letters*, [s.l.], v.26, p.911-5, 2004.
- CHO, S. H. et al. Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes for Transdermal Delivery: Preparation, Inclusion Properties, Stability, and Release Behavior. *J. Ind. Eng. Chem.*, [s.l.], v.12, p.50-9, 2001.
- CHOI, K. et al. Amphotericin B-Incorporated Polymeric Micelles Composed of Poly(d,l-Lactide-Co-glycolide)/Dextran Graft Copolymer. *International Journal of Pharmaceutics*, [s.l.], v.355, p.224-30, 2008.
- CHURCH JR., F. C.; MEYERS, S. P. Alpha-Galactosidase from *Pichia guilliermondii*. *Mycologia*, [s.l.], v.72, p.279-87, 1980.
- CLARET, C et al. Physiology of Glucanobacter Oxydans During Dihydroxyacetona Production from Glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v.41, p.359-65, 1994.
- CLAY, J. G. M. D. et al. Dextran Polymer Hemostatic Dressing Improves Survival in Liver Injury Model. *Journal of Surgical Research*, [s.l.], v.155, p.89-93, 2008.
- COELHO, L. F. et al. Improvement of L-(+) Lactic Acid Production from Cassava Wastewater by *Lactobacillus rhamnosus* B103. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, [s.l.], v. 90, p.1944-50, 2010.
- . et al. D-(-) Lactic Acid Production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 Using Different Carbon and Nitrogen Sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011. (in press)
- . et al. Lactic Acid Production by New *Lactobacillus plantarum* LMISM6 Grown in Molasses: Optimization of Medium Composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, [s.l.], v.28, p.27-36, 2011.
- COMMISSION DECISION. *Authorising the Placing on the Market of Alpha-Cyclodextrin as a Novel Food Ingredient Under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council*. Disponível em: <[http://www.fsai.ie/legislation/food/eu\\_docs/Novel\\_Foods\\_and\\_Ingredients/Dec2008](http://www.fsai.ie/legislation/food/eu_docs/Novel_Foods_and_Ingredients/Dec2008)>. Acesso em: 13 dez. 2008.

- CORTEZI, M.; CONTIERO, J. *Estudo da produção de dextranasacarase por Leuconostoc mesenteroides FT 045 B*. Rio Claro, 2004. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- COSTA, F. A. A. *Estudo da otimização do meio de cultura para produção de ácido cítrico por Candida lipolytica*. Campinas, 2000. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
- COSTA, S. G. V. A. O. et al. Cassava Wastewater as a Substrate for the Simultaneous Production of Rhamnolipids and Polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Heidelberg, v.36, p.1063-72, 2009.
- CROFT, A. P.; BARTSCH, R. A. Synthesis of Chemically Modified Cyclodextrins. *Tetrahedron*, [s.l.], v.39, p.1417-74, 1983.
- CROLLA, A.; KENNEDY, K. J. Optimization of Citric Acid Production from *Candida lipolytica* Y-1095 Using *n*-Paraffin. *Journal of Biotechnology*, [s.l.], v.89, p.27-40, 2001.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Fed-Batch Production of Citric Acid by *Candida lipolytica* Grown on *n*-Paraffins. *Journal of Biotechnology*, [s.l.], v.110, p.73-84, 2004.
- DAIUTO, E. R.; CEREDA, M. P.; CARVALHO, L. J. C. B. Características e propriedades do amido extraído de camadas do tecido da raiz de mandioca cv. mico (*Manihot esculenta Crantz*). *Braz. J. Food Technol.*, [s.l.], v.5, p.217-23, 2002.
- DANIEL, R.; BOBIK, T. A.; GOTTSCHALK, G. Biochemistry of Coenzyme B-12-Dependent Glycerol and Diol Dehydratases and Organization of the Encoding Genes. *FEMS Microbiology Reviews*, [s.l.], v.22, n.5, p.553-66, 1999.
- DATTA, R.; HENRY, M. Lactic Acid: Recent Advances in Products, Processes and Technologies – a Review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, [s.l.], v.81, p.1119-29, 2006.
- \_\_\_\_\_. et al. Technological and Economical Potencial of Polylactic Acid and Lactic Acid Derivatives. *FEMS Microbiology*, [s.l.], v.16, p.221-31, 1995.
- DE BELDER, A. N. Medical Applications of Dextran and its Derivatives. In: DUITRIU, S. *Polysaccharides in Medicinal Applications*. New York: Marcel Dekker, 1996.
- DE LIMA, C. J. B. et al. Response Surface Optimization of D-(-) Lactic Acid Production from *Lactobacillus* SMI8 Using Corn Steep Liquor and Yeast Autolysate as Nitrogen Source. *African Journal of Biotechnology*, [s.l.], v.8, p.5842-6, 2009.
- \_\_\_\_\_. et al. L-(+) Lactic Acid Production by New *Lactobacillus rhamnosus* B103. *Journal of Microbial e Biochemical Technology*, [s.l.], v.2, p.64-9, 2010.
- \_\_\_\_\_; CONTIERO, J.; COELHO, L. F. The Use of Response Surface Methodology in Optimization of Lactic Acid Production: Focus on Medium Supplementation, Temperature and pH Control. *Food Technology and Biotechnology*, [s.l.], v.48, p.171-81, 2010.
- DECKWER, W. D. Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol. *FEMS Microbiology Reviews*, [s.l.], v.16, p.143-9, 1995.
- DEMAIN, A. L. *SIM*, [s.l.], v.60, n.4, jul.-aug. 2010.

- DEMIRBAS, M.; BALAT, M. Recent Advances on the Production and Utilization Trends of Bio-Fuels: A Global Perspective. *Energy Conversion and Management*, [s.l.], v.47, p.2371-81, 2006.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. *Microbiol. Mol. Rev.*, [s.l.], v.61, p.47-64, 1997.
- DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Fermentation of Glycerol by *Escherichia coli*: A New Platform for Metabolic Engineering. *Biotechnology and bioengineering*, [s.l.], v.94, n.5, p.821-29, 2006. Disponível em: <<http://www.webpages.uidaho.edu/~bhe/pdfs/asabe066223.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2008.
- DODZIUK, H. Cyclodextrins and their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications. Warsaw: Wiley-VCH, 2006. 489p.
- EGGLESTON, G.; COTE, G. L. *Oligosaccharides in Food and Agriculture*. Washington, DC: ACS symposium series 849, 2003, p.1-15.
- EMBRAPA. *Produtos da fécula de mandioca é tema do Prosa Rural*. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2007/julho/foldernoticia.2007-0705.5605721790/noticia.2007-07-11.3772688973>>. Acesso em: 3 abr. 2008.
- EU Patent. *European Patent Office*, 2010. Disponível em: <<http://WWW.epo.org>>. Acesso em jan. 2010.
- EUZEBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: A Folder Available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*, [s.l.], v.36, p.1-29, 2006. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/>>.
- FARIA, R. C. et al. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel: diesel utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas. *Química Nova*, [s.l.], v.30, p.1900-05, 2007.
- FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, [s.l.], v.28, n.1, p.19-23, 2005
- FERREIRA, J. R.; CRISTO, C. M. *O futuro da indústria: biodiesel*. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior – MDIC Instituto Euvaldo Lodi – IEL/Núcleo Central, p.145, 2006.
- FIECHTER, A. *Trends in Biotechnol.*, [s.l.], v.10, p.208-17, 1992.
- FINOGENOVA, T. V. et al. Organic Acid Production by the Yeast *Yarrowia lipolytica*: A Review of Prospects. *Applied Biochemistry and Microbiology*, [s.l.], v.41, p.418-25, 2005.
- FISCHER, G.; SCHRATTENHOLZER, L. Global Bioenergy Potentials Through 2050. *Biomass & Bioenergy*, Pergamon, [s.l.], v.20, p.151-9, 2001.
- FOOD, S. *Opinion of the Scientific Committee on Food on a Dextran Preparation, Produced Using Leuconostoc mesenteroides, Saccharomyces Cerevisiae and Lactobacillus spp., as a Novel Food Ingredient in Bakery Products*. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, 2000.
- FREDLUND, E. et al. Metabolite Profiles of the Biocontrol Yeast *Pichia anomala* J121 Grown Under Oxygen Limitation. *Applied microbiology and biotechnology*, [s.l.], v.64, p.403-9, 2004.

- FREITAS, T. L.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Production of CGTase by a *Bacillus alcalophilus* CGII Strain Isolated from Wastewater of Manioc flour industry. *Braz. J. Microb.*, [s.l.], v.35, p.225-60, 2004.
- GAJANAYAKE, T. et al. Dextran Sulfate Reduces Ischaemia/Reperfusion Injury by Modulating the Activation of Complement and the MAPK Pathway. *Molecular Immunology*, [s.l.], v.45, p.4095-182, 2008.
- GALDEANO-VILLEGAS, C. et al. Fermentation of Glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella oxytoca* NRTL B-199: Study of Product Inhibition. *Journal of Biotechnology*, [s.l.], v.131, p.S102-S102, 2007.
- GANESH, K. C. et al. *J. Microbiol. Biotechnol.*, [s.l.], v.20, p.1061-8, 2010.
- GARVIE, E. I. Bacterial Lactate Dehydrogenases. *Microbiology Reviews*, [s.l.], v.44, p.106-39, 1980.
- GAWAND, B. N.; PATKAR, A. Y. Purification and Properties of a Novel Raw Starch Degrading-Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS- 22. *Enzyme Microb. Tech.*, [s.l.], v.28, p.735-43, 2001.
- GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology – a Sustainable Alternative for Chemical Industry. *Biotechnol Adv.*, v.23, p.471-99, 2005.
- GERIS, R. et al. Biodiesel de soja: reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Química Nova*, [s.l.], v.30, p.1369-73, 2007.
- GIL, E. C. et al. Sugar Cane Native Dextran as an Innovative Functional Excipient for the Development of Pharmaceutical Tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, [s.l.], v.68, p.319-29, 2008.
- GONZÁLEZ-PAJUELO, M. et al. Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol: Physiological Comparison of a Natural Producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an Engineered Strain, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). *Applied and Environmental Microbiology*, [s.l.], v.72, p.96-101, 2006.
- GORNÁS, P. et al. Beta-Cyclodextrin Complexes with Chlorogenic and Caffeic Acids from Coffee Brew: Spectroscopic, Thermodynamic and Molecular Modelling Study. *Food Chem.*, [s.l.], v.114, p.190-6, 2009.
- GOULAS, A. K. et al. Synthesis of Isomaltoligosaccharides and Oligodextrans by the Combined Use of Dextranase and Dextranase. *Enzyme Microb. Technol.*, [s.l.], v.35, p.327-38, 2004.
- GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Appl. Environ. Microbiol.*, [s.l.], v.48, n.2, p.301-5, 1984.
- . *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, [s.l.], v.24, p.443-8, 1986.
- GUNARATNE, A.; CORKE, H. Influence of Unmodified and Modified Cycloheptaamylose ( $\beta$ -Cyclodextrin) on Transition Parameters of Amylase-Lipid Complex and Functional Properties of Starch. *Carbohydr. Polym.*, [s.l.], v.68, p.226-34, 2007.
- HAIYEE, Z. A. Characterization of Cyclodextrin Complexes with Turmeric Oleoresin. *Food Chem.*, [s.l.], v.114, p.459-65, 2009.
- HÁJEK, M.; SKOPAL, F.; MACHEK, J. Determination of Free Glycerol in Biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*, [s.l.], v.108, n.8, p.666-9, 2006.

- HAMDANI, G. et al. Dextran Solum sulfate Induced Colitis Causes Rapid Bone Loss in Mice. *Bones*, [s.l.], v.43, p.945-50, 2008.
- HAMISSA F. A.; ABOU-ZEID, A. Z; RADWAN, A. A. Influence of Micronutrients on Citric Acid Production by *Candida lipolytica* (Y 1095). *Zentralbl Bakteriell Naturwiss*, [s.l.], v.135, p.332-8. 1980.
- HENNING, S. B. et al. *Res. J. Biotechnol.*, [s.l.], v.3, n.1, p.45-9, 2008.
- HERETSCH, P. et al. Syntheses With a Chiral Building Block from the Citric Acid Cycle: (2R,3S)-Isocitric Acid by Fermentation of Sunflower Oil. *Angewandte Chemie* (international edition in english), [s.l.], v.47, p.1958-60, 2008.
- HOFVENAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources. *Enzyme and Microbial Technology*, [s.l.], v.26, p.87-107, 2000.
- HOMANN, T. et al. Fermentation of Glycerol to 1,3-Propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* Strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v.33, n.2, p.121-6, 1990.
- HUANG, L. et al. Effect of Coating on Post-Drying of Freeze-Dried Strawberry Pieces. *J. Food Eng.*, [s.l.], v.92, p.107-11, 2009.
- HUIJBERTS, G. N. M. et al. *Pseudomonas putida* KT2442 Cultivated on Glucose Accumulates Poly (3-Hydroxyalkanoates) Consisting of Saturate and Unsaturated Monomers. *Appl. Environ. Microbiology*, [s.l.], v.58, p.536-44, 1992.
- IL'CHENKO, A. P. et al. Metabolism of *Yarrowia lipolytica* Grown on Ethanol under Conditions Promoting the Production of  $\alpha$ -Ketoglutaric and Citric Acids: A Comparative Study of the Central Metabolism Enzymes. *Microbiology*, v.71, n.3, p.269-74, 2002.
- IMANDI, S. B. et al. Optimization of Medium Constituents for the Production of Citric Acid From Byproduct Glycerol Using Doehlert Experimental Design. *Enzyme and Microbial Technology*, [s.l.], v.40, p.1367-72, 2007.
- JAMES, J. S. Dextran Sulfate: New Promising Antiviral. *AIDS Treat News* (electronic journal), [s.l.], v.50, 1988.
- JEULIN, H. et al. Effective Ribavirin Concentration in Mice Brain Using Cyclodextrin as a Drug Carrier: Evaluation in Measles Encephalitis. *Antiviral Res.*, [s.l.], 2009. (no prelo)
- JUKES, J. M. et al. A Newly Developed Chemically Crosslinked Dex-PEG Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part. A*, [s.l.], 2008.
- KABOLI, H.; REILLY, P. J. Immobilization and Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Dextranase. *Biotechnol. Bioeng.*, [s.l.], v.22, p.1055-69, 1980.
- KAJIURA, H. et al. Characterization and Mechanism of Action of a Reactivating Factor for Adenosylcobalamindependent Glycerol Dehydratase. *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v.276, n.39, p.36514- 9, 2001.
- KALOGIANNIS, S. et al. Optimization of Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris* Grown in Molasses. *Process Biochemistry*, [s.l.], v.39, n.2, p.249-56, 2003.

- KAMZOLOVA, S. V. et al. Oxygen Requirements for Growth and Citric Acid Production of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, [s.l.], v.1528, p.1-6, 2003.
- KANDLER, O. Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v.49, p.209-24, 1983.
- KANDLER, O.; WEISS, N. Lactobacillus. In: SNEATH, P. H. A. et al. Lactic Acid Production in a Cell Retention Continuous Culture Using Lignocellulosic Hydrolysate as a Substrate. *J. Biotechnol.*, [s.l.], v.56, p.25-31, 1997.
- KIM, Y. M. et al. Construction of a Fusion Enzyme of Dextranucrase and Dextranase: Application for One-Step Synthesis of Isomalto-Oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, [s.l.], v.44, p.159-64, 2009.
- KÖHLER, T. et al. *J. Bacteriol.*, [s.l.], v.182, p.5990-6, 2000.
- KOLLER, M. et al. Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and Surplus Materials. *Biomacromolecules*, Washington, v.6(2), p.561-5, 2005.
- KOTZAMANIDIS, C.; ROUKAS, T.; SKARACIS, G. Optimization of Lactic Acid Production from Beet Molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v.18, p.441-8, 2002.
- KURIAN, J. V. A New Polymer Platform for the Future Sorona from Corn Derived 1,3-Propanediol. *J Polymers and the Environment*, [s.l.], v.13, p.159-67, 2005.
- LEATHERS, T. D. Dextran, in Biopolymers. In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBUCHER, A. *Polysaccharides I: Polysaccharides from Prokaryotes*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, p.299-321. v.5.
- LEE, P.C. et al. Succinic Acid Production with Reduced by-Product Formation in the Fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* Using Glycerol as a Carbon Source. *Biotechnology Bioengineering*, [s.l.], v.72, p.41-8, 2001.
- LEVINSON, W.; KURTZMAN, C.; KUO, T. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and Related Species for Citric Acid Production from Glycerol. *Enzyme and Microbial Technology*, [s.l.], v.41, p.292-5, 2007.
- LIMA, S. A. Desenvolvimento rural biodiesel: combustível sustentável? *Revista Brasileira de Agroecologia*, [s.l.], v.2, p.359-62, 2007.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia: tecnologia das fermentações*. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. v.1
- LIN, R. et al. Enhancement of 1,3-Propanediol Production by *Klebsiella pneumoniae* with Fumarate Addition. *Biotechnology Letters*, v.27, p.1755-9, 2005.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, [s.l.], v.69, p.627-42, 2006.
- LIU, Y.; CHAN-PARK, M. B. Hydrogel Based on Interpenetrating Polymer Networks of Dextran and Gelatin for Vascular Tissue Engineering. *Biomaterials*, [s.l.], v.30, p.196-207, 2009.
- LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their Pharmaceutical Applications. *Int. J. Pharm.*, [s.l.], v.329, p.1-11, 2007.
- LOVAGLIO, R. B. et al. *Res. J. Biotechnol.*, [s.l.], v.5, n.3, p.19-24, 2010.
- LYND, L. R. et al. Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass: An Update. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v.16, p.577-83, 2005.

- MA, F; HANNA, M. A. Biodiesel Production: A Review. *Bioresource Technology*, [s.l.], v.70, p.1-15, 1999.
- MA, Z. et al. Production of 1,3-Propanediol from Glycerol by Engineered *Escherichia coli* Using a Novel Co-Expression Vector. *African Journal of Biotechnology*, [s.l.], v.8, n.20, p.5500-05, 2009.
- MAERVOET, V. E. T. et al. Enhancing the Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol Using Metabolic Engineering. *Organic Process Research & Development*, [s.l.], v.15, p.189-202, 2011.
- MAHAT, M. K. et al. Production of Cyclodextrin Glucanotransferase (CGTase) from *alkalophilic Bacillus* sp. TS1-1: Media Optimization Using Experimental Design. *Enzyme Microb. Technol.*, [s.l.], v.35, p.467-73, 2004.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, [s.l.], v.58, p.428-34, 2002.
- MANRESA, A. et al. *Society for Ind. Microbiol.*, [s.l.], v.8, p.133-6, 1991.
- MARIN, L. J. et al. Desenvolvimento de uma metodologia de PCR semiquantitativa utilizando plasmídeo clonado com parte do gene GB de citomegalovírus: descrição de métodos, técnicas e instrumentais. *Medicina*, Ribeirão Preto, v.35, p.85-94, 2002.
- MATA-SANDOVAL, J. C.; KARNS, J.; TORRENTS, A. J. *Chromatogr. A.*, [s.l.], v.864, p.211-20, 1999.
- MATIOLI, M.; ZANIN, G.; MORAES, F. F. Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais. 5.ed. New York: [s.n.], 2000. 124p.
- MCCOY, M. Cyclodextrins: Great Product Seeks a Market. *Chem. Eng. News*, [s.l.], v.77, p.25-7, 1999.
- . Glycerin Surplus. *Chem. Eng. News*, [s.l.], v.84, n.6, p.7, 2006.
- MERJI, M. et al. Hydration and Self-Association of Caffeine Molecules in Aqueous Solution: Comparative Effects of Sucrose and  $\beta$ -Cyclodextrin. *Mol. Biomol. Spectrosc.*, [s.l.], 2009. (no prelo)
- MOOSAVI-NASAB, M. et al. Fermentative Production of Dextran Using Food Industry Wastes World. *Academy of Science, Engineering and Technology*, [s.l.], v.68, p.1231-3, 2010.
- MORIWAKI, C. et al. Production and Characterization of a New Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus firmus* Isolated from Brazilian Soil. *Process. Biochem.*, [s.l.], v.42, p.1384-90, 2007.
- MOTHES, G.; SCHNORPFEIL, C.; ACKERMANN, J. U. Production of PHB from Crude Glycerol. *Eng. Life Sci.*, [S.l.], v.7, n.5, p.475-9, 2007
- MU, Y. et al. Microbial Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae* Using Crude Glycerol from Biodiesel Preparations. *Biotechnology Letters*, [s.l.], v.28, p.1755-9, 2006.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. *Trends Biotechnol.*, [s.l.], v.24, n.11, p.509-15, 2006.



- MÜLLER, M. M. et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, [s.l.], v.187, p.167-74, 2010.
- MULLIGAN, C. N. *Environ. Pollution*, Barking, v.133, p.183-98, 2005.
- . *Curr. Op. Coll. Interf. Sci.*, [s.l.], v.14, p.372-8, 2009.
- ; GIBBS, B. F. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.55, p.3016-9, 1989.
- ; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B. F. *J. Bacteriol.*, [s.l.], v.12, p.199-210, 1989.
- MURPHY, J. D.; POWER, N. Technical and Economic Analysis of Biogas Production in Ireland Utilising Three Different Crop Rotations. *Applied Energy*, [s.l.], v.86, p.1-11, 2008.
- NAESSENS, M. et al. *Leuconostoc* Dextranase and Dextran: Production, Properties and Applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, [s.l.], v.80, p.845-60, 2005.
- NAKAMURA, J. et al. Water-Soluble Taxol Conjugates with Dextran and Targets Tumor Cells by Folic Acid Immobilization. *Anticancer Res.*, [s.l.], v.30(3), p.903-9, 2010.
- NAMAZI, H.; KANANI. A Investigation Diffusion Mechanism of b-Lactam Conjugated Telechelic Polymers of PEG and b-Cyclodextrin as the New Nanosized Drug Carrier Devices. *Carbohydr. Polym.*, [s.l.], v.76, p.46-50, 2009.
- NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P. K.; SRIVASTAVA, A. L (+) Lactic Acid Fermentation and its Product Polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, [S.l.], v.7, n.2, p.167-79, 2004.
- NARITA, J. et al. Efficient Production of L-(+)-Lactic Acid from Raw Starch by *Streptococcus bovis* 148. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, [s.l.], v.97, p.423-5, 2004.
- NAVEENA, B. J. et al. Selection of Medium Components by Plackett-Burman Design for Production of L (+) Lactic Acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF Using Wheat Bran. *Bioresource Technology*, [s.l.], v.96, p.485-90, 2005.
- NEU, B.; WENBY, R.; MEISELMAN, H. J. Effects of Dextran Molecular Weight on Red Blood Cell Aggregation. *Biophysical Journal*, [s.l.], v.95, p.3059-65, 2008.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A.; CONTIERO, J. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, [s.l.], v.160, p.2066-74, 2010.
- NITSCHKE, M. et al. *Biotechnol. Prog.*, [s.l.], v.21, p.1562-6, 2005.
- ; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* C7L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.21, n.1, p.82-5, jan./abr. 2001.
- NOUVEL, C. et al. Biodegradable Nanoparticles Made from Polylactide-Grafted Dextran Copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science*, [s.l.], v.330, p.337-43, 2009.
- OH, H. et al. Lactic Acid Production from Agricultural Resources as Cheap Raw Materials. *Bioresource Technology*, [s.l.], v.96, p.1492-8, 2005.
- OONNITTAN, A.; SHRESTHA, R. A.; SILLANPAA, M. Removal of Hexachlorobenzene from Soil by Electrokinetically Enhanced Chemical Oxidation. *J. Haz. Mat.*, [s.l.], v.162, p.989-93, 2009.

- PACHAURI, N.; HE, B. *Value-Added Utilization of Crude Glycerol from Biodiesel Production. A Survey of Current Research Activities American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASABE)*. Paper N.06622, 2006. Disponível em: <<http://www.webpages.uidaho.edu/~bhe/pdfs/asabe066223.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2008.
- PALANISAMY, P.; RAICHUR, A. M. *Mater. Sci. Eng. C. Biomim. Supramol. Syst.*, [s.l.], v.29, p.199-204, 2009.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological Potential of Agro-Industrial Residues. I: Sugar Cane Bagasse. *Bioresour. Technol.*, [s.l.], v.74, p.69-80, 2000.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Production by *Yarrowia lipolytica* Growing on Industrial Glycerol in a Single-Stage Continuous. *Bioresour. Technol.*, [s.l.], v.82, p.43-9, 2002.
- \_\_\_\_\_. et al. *Yarrowia lipolytica* as a Potential Producer of Citric Acid from Raw Glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, [s.l.], v.92 p.737-44, 2002.
- \_\_\_\_\_. et al. Biotechnological Valorization of Raw Glycerol Discharged after Bio-Diesel (Fatty Acid Methyl Esters) Manufacturing Process: Production of 1,3-Propanediol, Citric Acid and Single Cell Oil. *Biomass and Bioenergy*, [s.l.], v.32, p.60-71, 2008.
- \_\_\_\_\_. et al. Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica* Cultivated on Olive-Mill Wastewater-Based Media. *Bioresour. Technol.*, [s.l.], v.99, p.2419-28, 2008.
- PARENTE, E. J. Uma aventura tecnológica num país engraçado. *TECBio*, Fortaleza, 2003. 68p. Disponível em: <[www.iadb.org/intal/inalcdi/PE/2008/01430.pdf](http://www.iadb.org/intal/inalcdi/PE/2008/01430.pdf)>. Acesso em: 29 jan. 2010.
- PARK, E. Y.; KOSAKAI, Y.; OKABE, M. Efficient Production of L-(+) Lactic Acid Using Mycelial Cotton-Like Floccs of *Rhizopus oryzae* in an Air-Lift Bioreactor. *Biotechnology Progress*, [s.l.], v.14, p.699-704, 1998.
- \_\_\_\_\_; ANH, P. N.; OKUDA, N. Bioconversion of Waste Office Paper to L-(+)-Lactic Acid by the Filamentous Fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresour. Technol.*, [s.l.], v.93, p.77-83, 2004
- PASTERIS, S. E.; STRASSER DE SAAD, A. M. Transport of Glycerol by *Pediococcus pentosaceus* Isolated from Wine. *Food microbiology*, [s.l.], v.25, p.545-49, 2008.
- PATEL, R. M.; DESAI, A. J. *Lett. Appl. Microbiol.*, [s.l.], v.25, p.91-4, 1997.
- PHARMACIA.BIOTECH. Dextran 50 Years – Still Going Strong. *Downstream*, [s.l.], 2v.4, p.10-3, 1997.
- PIRET, J. et al. In Vitro and in Vivo Evaluations of Sodium Lauryl Sulfate and Dextran Sulfate as Microbicides Against Herpes Simplex and Human Deviciency Viruses. *J. Clin. Microbiol.*, [s.l.], v.38, p.110-9, 2000.
- PIRÔLLO, M. P. S. et al. *J. Appl. Microbiol.*, [s.l.], v.105, n.5, p.1484-90, 2008.
- PONDEY, A. et al. *Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications*. New Delhi: Asiatech Publishers, 2001.
- PORATH, J.; FLODIN, P. Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation. *Nature*, [s.l.], v.183, p.1657-9, 1959.

- PROVENZI, G. et al. Estabilidade de antocianinas de uvas cabernet sauvignon com  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas. *Braz. J. Food Technol.*, [s.l.], v.9, p.165-70, 2006.
- QUIZHUO, Z.; WEIMIN, C.; JUAN, W. *J. Environ. Sci.*, [s.l.], v.20, p.975-80, 2008.
- QUEIRÓZ, J. H. *Contribuição ao estudo da dextranasacarase por Leuconostoc mesenteroides*. Campinas, 1987. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas (Unicamp).
- R7NOTÍCIAS. Preço do barril do petróleo deve passar de R\$ 170 com crise no Egito. Disponível em: <<http://noticias.r7.com/economia/noticias/preco-do-barril-do-petroleo-deve-passar-de-r-170-com-crise-no-egito> 20110202.html>. Acesso em: 15 maio 2011.
- RAHMAN, K. S. M. et al. *Biotechnol. Prog.*, [s.l.], v.18, p.1277-81, 2002.
- RANE, K. D.; SIMS, K. A. Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica*: Effect of Nitrogen and Biomass Concentration on Yield and Productivity. *Biotechnology Letters*, [s.l.], v.18, n.10, p.1139-44, 1996.
- RATHMANN, R. et al. Biodiesel: uma alternativa estratégica na matriz energética brasileira? *Seminário de Gestão de Negócios, II*. Curitiba – PR, v.1, 2005.
- RAWAT, S.; JAIN, S. K. Solubility Enhancement of Celecoxib Using  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *European J. Pharm. Biopharm.*, [s.l.], v.57, p.263-7, 2004.
- RAZA, Z. A. et al. *Biodegradation*, [s.l.], v.18, p.115-21, 2007.
- REMAUD-SIMEON, M. et al. Glucansucrases: Molecular Engineering and Oligosaccharide Synthesis. *J. Mol. Catal. B.*, [s.l.], v.10, p.117-28, 2000.
- RIBEIRO, A. O.; SERRA, O. A. Spectroscopic Study of  $Tb^{3+}$ (b-Diketonate)<sub>3</sub>:  $\alpha$ -Cyclodextrin Inclusion Compounds in Aqueous Solution. *J. Braz. Chem. Soc.*, [s.l.], v.18, p.273-8, 2007.
- RIBEIRO, E. J.; COUTINHO FILHO, U.; CERIBELLI, E. *Estudo cinético da produção de dextrana por dextranasacarase*. Uberlândia, 1998, Universidade Federal de Uberlândia, Departamento de Bioquímica.
- RIBEIRO, R. R. et al. *Otimização da produção de ácido cítrico utilizando como substrato glicerol por Yarrowia lipolytica*. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. 2009. Disponível em: <<http://www.ocs.ufu.br/index.php/cobeqic2009/cobeqic2009/paper/view/536>> Acesso em: 4 out. 2009.
- RICHTER, K., TRAGER, A. L(+) Lactic Acid from Sweet Sorghum by Submerged and Solid State Fermentations. *Acta Biotechnol.*, [s.l.], v.14, p.367-78, 1994.
- ROJAN, P. J. et al. L(+)-Lactic Acid Production Using *Lactobacillus casei* in Solid-State Fermentation. *Biotechnol. Lett.*, [s.l.], v.27, p.1685-8, 2005.
- ROBERT, M. et al. *Biotechnol. Lett.*, [s.l.], v.1, n.2, p.871-4, 1989.
- ROBYT, J. F. *Dextran*. Encyclopaedia of Polymer Science. New York: Wiley-VCH, 1985. p.753-67. v.4.
- RODAL, S. K. et al. Extraction of Cholesterol With Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin Perturbs Formation of Clathrin-Coated Endocytic Vesicles. *Mol. Biol. Cell*, [s.l.], v.10, p.961-74, 1999.

- ROUKAS T. Pretreatment of Beet Molasses to Increase Pullulan Production. *Process Biochemistry*, [s.l.], v.33, p.805-10, 1998.
- ROULEAU, L.; ROSSI, J.; LEASK, R. L. Concentration and Time Effects of Dextran Exposure on Endothelial Cell Viability, Attachment and Inflammatory Marker Expression in Vitro. *Annals of Biomedical Engineering*, [s.l.], v.38, p.1451-62, 2010.
- RUMBALL, C. W. H. et al. A Method for Assessment of Blood Volume Parameters in Pregnant Sheep Using Fluorescein Labelled Dextran. *Placenta*, [s.l.], v.29, p.15-9, 2008.
- RYMOWICZ, W.; CIBIS, E. Optimization of Citric Acid Production from Glucose Syrup by *Yarrowia lipolytica* Using Response Surface Methodology. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, [s.l.], v.9, p.1-12, 2006.
- ; RYWIŃSKA, A.; GŁADKOWSKI, W. Simultaneous Production of Citric Acid and Erythritol from Crude Glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratlslavia K1. *Chemical Papers*, [s.l.], v.62, p.239-46, 2008.
- RYWIŃSKA, A.; WOJTATOWICZ, M.; RYMOWICZ, W. Citric Acid Biosynthesis by *Yarrowia lipolytica* a-101-1.31 under Deficiency of Various Medium Macromolecules. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Biotechnology*, [s.l.], v.9, 2006.
- SAKATA, M. M.; RINCON, M. C. A.; DUEK, E. A. R. Estudos da interação polímero/cartilagem/osso utilizando Poli (ácido láctico – co – ácido glicólico) e Poli (p-Dioxanona) em condilo femoral de coelhos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, [s.l.], v.24, n.3, p.176-80, 2004.
- SALIPIRA, K. L. et al. Carbon Nanotubes and Cyclodextrin Polymers for Removing Organic Pollutants from Water. *Earth Envir. Sci.*, [s.l.], v.5, p.13-7, 2006.
- SANCHES, S.; DEMAİN, A. L. Metabolic Regulation and Overproduction of Primary Metabolites. *Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v.1, p.283-319, 2008
- SARWAT, F. et al. Production & Characterization of a Unique Dextran from an Indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713. *Int. J. Biol. Sci.*, [s.l.], v.4(6), p.379-86, 2008.
- SASIKALA, K.; ARUNACHALAM, S. Studies on Outer-Sphere Electron Transfer between Iron(II) and some Surfactant–Cobalt (III) Complexes in Micelles as Well as in  $\beta$ -Cyclodextrin. *Colloid Surface A*, [s.l.], v.335, p.98-102, 2009.
- SAUER, M. et al. Microbial Production of Organic Acids: Expanding the Markets. *Trends in biotechnology*, [s.l.], v.26, p.100-8, 2008.
- SCHLEIFER, K. H. Gram Positive Cocci. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2.ed. Baltimore: Williams eWilkins Press, 1986, p.1043-74.
- SCHMIDELL, W. Microorganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: LIMA, U. A. et al. *Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: E. Blucher, 2001, p.5-38. v.2.
- SCIOLI, C.; VOLLARO, L. The Use of *Yarrowia lipolytica* to Reduce Pollution in Olive Mill Wastewaters. *Water Research*, [s.l.], v.31, p.2520-4, 1997.

- SEGALL, S. et al. The Biodiesel Production Using Inexpensive Tropical Oils. In: *AOCS Annual Meeting & Expo*, 97. USA, 2006.
- SEO, E. et al. Synthesis of Thermo- and Acid-Stable Novel Oligosaccharides by Using Dextrantransferase with High Concentration of Sucrose. *Enzyme and Microbial Technology*, [s.l.], v.40, p.1117-1123, 2007.
- SEON, K. H.; AHN, J.; KWAK, H. S. The Accelerated Ripening of Cholesterol-Reduced Cheddar Cheese by Crosslinked  $\beta$ -Cyclodextrin. *J. Dairy Sci.*, [s.l.], v.92, p.49-57, 2009.
- SETHI, V.; MAINI, S. B. *Biotechnology: Food Fermentation*. New Delhi: Asiatech Publishers, 1999.
- SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986, p.1209-34.
- SHEPPARD, J. D.; COPPER, D. G. *The J. Chem. Technol. Biotechnol.*, [s.l.], v.48, p.325-36, 1990.
- SHIBATA, N. et al. Substrate-Induced Conformational Change of a Coenzyme B12-Dependent Enzyme: Crystal Structure of the Substrate-Free Form of Diol Dehydratase. *Biochemistry*, Moscow, v.41, n.42, p.12607-17, 2002.
- SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A Promising and Abundant Carbon Source for Industrial Microbiology. *Biotechnology advances*, [s.l.], v.27, p.30-9, 2009.
- SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Aproveitamento de agroindustriais: ácido láctico, uma alternativa. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, n.1, p.37-40, 1991.
- SILVA, S. N. R. L. *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, [s.l.], v.79, p.174-83, 2010.
- SINGH, S. K.; AHMED, S. U.; PANDEY, A. Metabolic Engineering Approaches for Lactic Acid Production. *Proc. Biochem.*, [s.l.], v.41, p.991-1000, 2006.
- SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. *Trends in Biotechnol.*, [s.l.], v.22, n.3, p.142-6, 2004
- SOCCOL, C. R. et al. New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technology and Biotechnology*, [s.l.], v.44, p.141-9, 2006.
- SODEGARD, A., STOLT, E. M. Properties of Lactic Acid Based Polymers and their Correlation with Composition. *Progress in Polymer Science*, [s.l.], v.27, p.1123-63, 2002.
- SOETAERT, W.; VANDAMME, E. The Impact of Industrial Biotechnology. *Biotechnol. J.*, [s.l.], v.1, p.756-69, 2006.
- SOLAIMAN, D. K. Y. et al. Conversion of Agricultural Feedstock and Coproducts into Poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v.71, p.783-9, 2006.
- SPIRIG, R. et al. The Complement Inhibitor Low Molecular Weight Dextran Sulfate Prevents TLR2 Mediated Activation of Human Natural Killer Cells. *Molecular Immunology*, [s.l.], v.45, p.4095-182, 2008.
- STATSOFT, INC. STATISTICA. (data analysis software system), version 7.1. www.statsoft.com. 2005.

- STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic Acids. In: BYRON, D. *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources*. New York: Stockton Press, 1991, p.123-213.
- ; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and Other Biological Systems for Polyester Production. *Trends Biotechnol.* [s.l.], v.16, p.419-27, 1998.
- SUH S.-O.; BLACKWELL, M. Three New Beetle-Associated Yeast Species in the *Pichia guilliermondii* Clade. *FEMS Yeast Research*, [s.l.], v.5, p.87-95, 2004.
- SURIYAMONGKOL, P. et al. Biotechnological Approaches for the Production of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms and Plants – A Review. *Biotechnol. Advances*, San Diego, v.25, p.148-75, 2007.
- SUTHERLAND, I. A Sticky Business: Microbial Polysaccharides: Current Products and Future Trends. *Microbiology Today*, [s.l.], v.29, p.70-1, 2002.
- SYLDATK, C.; LANG, S.; WAGNER, F. Zeitschrift fur Naturforschung C-A. *Journal of Biosciences*, [s.l.], v.40, n.1-2, p.51-60, 1985.
- SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as Food Ingredients. *Trends Food Sci. Tech.*, [s.l.], v.15, p.137-42, 2004.
- SZERMAN, N. et al. Cyclodextrin Production by Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R. *Bioresource Technol.*, [s.l.], v.98, p.2886-91, 2007.
- TABASSI, S. A. S. T.; TAFAGHODI, M.; JAAFARI, M. R. Induction of High Antitoxin Titers Against Tetanus Toxoid in Rabbits by Intranasal Immunization with Dextran Microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, [s.l.], v.360, p.12-7, 2008.
- TANAKA, K.; KIMURA, K.; YAMAGUCHI, K. Patente Japonesa n° 13677, 1968.
- TANAKA, T. et al. Production of D-Lactic Acid from Defatted Rice Bran by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Bioresource Technology*, [s.l.], v.97, p.211-17, 2006.
- TANG, X. M. et al. Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol by an Engineered Strain of *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, [s.l.], v.75, n.6, p.1628-34, 2009.
- TIAN, W. et al. Cyclodextrin-Based Hyperbranched Polymers: Molecule Design, Synthesis and Characterization. *Macromolecules*, [s.l.], 2009.
- TONG, H. H. Y. et al. Anti-Hygroscopic Effect of Dextrans in Herbal Formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, [s.l.], v.363, p.99-105, 2008.
- UENO, A. Fluorescence Enhancement of  $\alpha$ -Naphthoxyacetic Acid in the Cavity of  $\gamma$ -Cyclodextrin, Assisted by a Space-Regulating Molecule. *J. Chem. Soc.*, [s.l.], p.194-5, 1981.
- UENO, R.; KUNO, S. Anti-HIV Synergism Between Dextran Sulfate and Zidovudine. *Lancet*, [s.l.], v.3, p.796-97, 1987.
- US Patent. United States Patent and Trademark Office, 2010. (An Agency of the United States Department of Commerce). Disponível em: <<http://www.uspto.gov>>. Acesso em: 19 jan. 2010.

- VANDAMME, E.; BIENFAIT, C. G. *Industrial Biotechnology and Sustainable Chemistry*. Brussels: Royal Belgian Academy Council of Applied Science, 2004, p.32.
- VARDHANABHUTI, B. et al. Interactions Between B-Lactoglobulin and Dextran Sulfate at Near Neutral pH and their Effect on Thermal Stability. *Food Hydrocolloids*, [s.l.], p.1-10, 2008.
- VASSILEVA, A. et al. Continuous Cyclodextrin Glucanotransferase Production by Free and Immobilized Cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783 in Bioreactors. *Process Biochem.*, [s.l.], v.40, p.3290-5, 2003.
- VENKATA RAMANA, K.; KARANTH, N. G. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, [s.l.], v.45, p.249-57, 1989.
- VENKATESH, K. V. Simultaneous Saccharification and Fermentation of cCellulose to Lactic Acid. *Bioresour Technol.*, [s.l.], v.62, p.91-8, 1997.
- VOLLENWEIDER, S.; LACROIX, C. 3-Hydroxypropionaldehyde: Applications and Perspectives of Biotechnological Production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v.64, p.16-27, 2004
- WANG, F. et al. Regulation of CCR in the  $\gamma$ -CGTase Production from *Bacillus macerans* by the Specific Cell Growth Rate Control. *Enzyme Microbial Tech.*, [s.l.], v.39, p.1279-85, 2006.
- WANG, S.; MULLIGAN, C. N. *Appl. Geochem.*, [s.l.], v.24, p.935-8, 2009.
- WANG, X. et al. *Harmful Algae*, [s.l.], v.4, p.433-43, 2005.
- WANG, Z.-X. et al. Glycerol Production by Microbial Fermentation: A Review. *Biotechnology Advances*, [s.l.], v.19, p.201-23, 2001.
- WEE, Y. J.; KIM, J. N.; RYU, H. W. Biotechnological Production of Lactic Acid and its Recent Applications. *Food Technology and Biotechnology*, [s.l.], v.44, p.163-72, 2006.
- WEE, Y. J. et al. Utilization of Sugar Molasses for Economical L-(+) Lactic Acid Production by Batch Fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, [s.l.], v.35, p.568-73, 2004.
- WEI, Q. F.; MATHER, R. R.; FOTHERINGHAM, A. F. *Biores. Technol.*, [s.l.], v.96, p.331-4, 2005.
- WENG, L. et al. Non-Cytotoxic, in Situ Gelable Hydrogels Composed of N-Carboxyethyl Chitosan and Oxidized Dextran. *Biomaterials*, [s.l.], v.29, p.3905-13, 2008.
- WIKIPÉDIA. O ácido polilático. *Wikimedia Foundation*. Disponível em: <[http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Polylactic\\_acid&oldid=407314317](http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Polylactic_acid&oldid=407314317)>. Acesso em: 19 fev. 2011.
- WILLKE, T. H.; VORLOP, K. D. Industrial Bioconversion of Renewable Resources as an Alternative to Conventional Chemistry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, [s.l.], v.66, p.131-42, 2004.
- WOICIECHOWSKI, A. L. et al. Acid and Enzymatic Hydrolysis to Recover Reducing Sugars from Cassava Bagasse: an Economic Study. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, [s.l.], v.45, p.393-400, 2002.
- WU, J. Y. et al. *Bioresour. Technol.*, [s.l.], v.99, n.5, p.1157-64, 2007.

- YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic Fermentation of Glycerol: A Path to Economic Viability for the Biofuels Industry. *Current Opinion in Biotechnology*, London, v.18, p.213-9, 2007.
- YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. *Proc. Biochem.*, [s.l.], v.41, p.1799-1805, 2006.
- YUSTE, A. J.; DORADO, M. P. A Neural Network Approach to Simulate Biodiesel Production from Waste Olive Oil. *Energy and Fuels*, Washington, v.20, p.399-402, 2006.
- ZANONI, G. et al. Dextran Specific IgG Response in Hypersensitivity Reactions to Measles-Umps-Rubella Vaccine. *J. Allergy Clin. Immunol.*, [s.l.], v.122(6), p.1233-5, 2008.
- ZATOR, M. et al. Chemical Cleaning of Polycarboate Membranes Fouled by BSA/Dextran Mixtures. *Journal of Membrane Science*, [s.l.], v.327, p.59-68, 2009.
- ZHANG, G. et al. *J. Zhejiang Univ. SCI*, [s.l.], v.6B, p.725-30, 2005.
- ZHANG, Q.; JU, L. K. *Enzyme Microbial Technol.*, [s.l.], v.48, p.175-80, 2011.
- ZHANG, X. M. et al. Construction of a Novel Recombinant *Escherichia coli* Strain Capable of Producing 1,3-Propanediol and Optimization of Fermentation Parameters by Statistical Design. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v.22, n.9, p.945-52, 2006.
- ZHOU, S. et al. Fermentation of 12% (w/v) Glucose to 1.2 M Lactate by *Escherichia coli* strain SZ194 Using Mineral Salts Medium. *Biotechnology Letters*, [s.l.], v.28, p.663-70, 2006.





## **Parte V**

# Sustentabilidade dos biocombustíveis



## Mudanças recentes na ocupação sucroalcooleira em decorrência da mecanização do corte de cana-de-açúcar no estado de São Paulo

*José Giacomo Baccharin,  
José Jorge Gebara,  
Janaina Gagliardi Bara*

### Introdução

Pode-se discutir a forma como ocorre o corte da cana-de-açúcar tanto do ponto de vista mais restrito, da gestão empresarial, quanto de perspectiva mais ampla, envolvendo temas como a geração de postos de trabalho, as relações sociais entre empresários e trabalhadores e a preservação ambiental. A princípio, há quatro possibilidades para aquela operação: corte manual de cana sem queimar, corte manual de cana queimada, corte mecânico de cana queimada e corte mecânico de cana sem queimar.

Na metade da década de 1960, no estado de São Paulo, o corte da cana-de-açúcar era feito, na quase totalidade, de maneira manual sem a queima prévia de sua palha. Na atualidade, o corte mecânico de cana sem queimar é predominante nos canaviais paulistas, tendo se verificado aceleração de seu uso após 2006. Também ocorreram modificações tecnológicas no plantio da cana-de-açúcar.

Ao mesmo tempo tem se verificado grande expansão da área plantada e da produção de cana-de-açúcar no estado. Assim, informações do Projeto Canasat indicam que o total cultivado com cana-de-açúcar em São Paulo passou de 3.002.676 hectares (ha) em 2003/04 para 5.303.342 ha em 2010/11: um crescimento de 76,6% (Inpe, 2011).

A expansão canavieira tende a afetar positivamente a geração de emprego ou ocupação canavieira, enquanto a mudança tecnológica, especialmente no corte de cana, tende a diminuir a necessidade de trabalhadores canavieiros não qualificados, mais especificamente dos cortadores de cana.

O objetivo do presente trabalho é analisar os efeitos das mudanças tecnológicas, com destaque para o corte de cana, na evolução do número de trabalhadores canavieiros não qualificados ocupados por empresas sucroalcooleiras no estado de São Paulo, *vis-à-vis* os demais tipos de ocupação dessas empresas, no período compreendido entre 2007 e 2010. Especificamente, pretende-se:

- a) Comparar a ocupação entre diferentes empresas sucroalcooleiras;
- b) Estimar o número de trabalhadores canavieiros não qualificados;
- c) Analisar mudanças na sazonalidade de ocupação dos trabalhadores canavieiros não qualificados;
- d) Estimar o número de pessoas ocupadas em atividades industriais, administrativas e de apoio e não sucroalcooleiras das empresas sucroalcooleiras;
- e) Comparar a evolução de diferentes categorias de ocupação com a evolução da área de cana-de-açúcar e da produção setorial.

Além da introdução, este capítulo está organizado em mais três seções. A primeira aborda as mudanças tecnológicas que ocorreram no cultivo, mais enfaticamente no corte da cana-de-açúcar em São Paulo, entre as décadas de 1960 e 2010, procurando captar suas motivações administrativas e sociais e consequências ambientais e sociais. A segunda refere-se à metodologia, com descrição das fontes e da forma como se trataram os dados de produção e ocupação sucroalcooleiras. A terceira é dedicada à interpretação dos resultados. Há ainda as considerações finais.

## **Mudanças tecnológicas no cultivo da cana-de-açúcar**

Costuma-se dividir a colheita da cana em três operações: o corte propriamente dito, o carregamento da cana cortada em veículos e seu transporte, em uma ou duas etapas, para o processamento industrial nas usinas e destilarias.

Até o final da década de 1960, as operações de corte e carregamento eram feitas manualmente. Havia trabalhadores que, com o uso do podão, se dedicavam ao corte da cana crua (sem queima prévia de sua palha) em um eito composto por três a cinco ruas da cultura. O produto cortado era depositado em leira contínua ou em feixes na rua central do eito. Outro grupo de trabalhadores carregava nas costas a cana cortada, muitas vezes subia uma escada e a depositava nas carrocerias de caminhões ou em carretas de tratores para seu transporte até as agroindústrias sucroalcooleiras.

No final da década de 1960, o carregamento da cana cortada passou a ser feito mecanicamente, por meio de guinchos acoplados a tratores. Também aumentou a capacidade de carga dos caminhões transportadores. Diante disso, tornou-se necessário ou aumentar o número de cortadores de cana por frente de trabalho ou elevar a quantidade de cana que cada um cortava diariamente.

Essa segunda opção acabou predominando, com a adoção da prática de queimar a palha da cana-de-açúcar horas antes de seu corte. Segundo relatos de empresários e trabalhadores, estima-se que com isso a quantidade de toneladas de cana cortada diariamente por trabalhador no mínimo dobrou ou mesmo triplicou. Além disso, a queimada do canavial afugentava animais peçonhentos e diminuía o número de ferimentos, inclusive nos olhos dos trabalhadores, causados pela palha da cana.

Portanto, a queimada proporcionou ganho significativo na produtividade do cortador de cana, o que certamente mais do que compensava seus custos empresariais. A adoção da queimada dos canaviais trouxe evidentes prejuízos ambientais, poluindo o ar e contribuindo para a destruição da fauna e flora nativas, não sendo raro o fogo dos canaviais atingir áreas de vegetação natural, acidentalmente ou não. Como a área com cana-de-açúcar era bem menor que na atualidade e a mobilização social na defesa do meio ambiente era menos expressiva, por muitos anos a reação contra a queimada dos canaviais não ganhou grande expressão.

Outro expediente usado desde então até a atualidade, para aumento da produtividade, é o pagamento do corte manual proporcionalmente à quantidade de cana cortada.

O corte manual de cana queimada generalizou-se entre o final da década de 1960 e o início da década de 1980, no estado de São Paulo, e consolidou-

-se o chamado sistema de cana de cinco ruas, correspondente à largura do eito de trabalho do cortador.

Na primeira metade da década de 1980 constatava-se grande contingente de trabalhadores rurais canavieiros no estado de São Paulo, como decorrência da expansão da produção de cana-de-açúcar, associada aos incentivos do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), de 1975. Isso estimulou, inclusive, o aumento do número de migrantes sazonais,<sup>1</sup> originados do norte de Minas Gerais e de alguns estados do Nordeste, para o corte de cana.

Por volta de 1983, vários empresários sucroalcooleiros tentaram implantar modificações no sistema de corte manual de cana. Visando reduzir custos com maquinário agrícola e obter cana cortada com menos terra impregnada, garantindo melhor rendimento industrial, procuraram elevar a largura do eito de trabalho de cinco para sete ruas, ou seja, de 6,0 para 9,0 metros, bem como aumentaram as exigências quanto à deposição da cana em montes na rua central (Gebara; Baccarin, 1984). Em face do maior esforço físico que o novo sistema de sete ruas impunha, a reação dos trabalhadores foi imediata e generalizada, com registro de várias greves e mobilizações sociais, como a revolta ocorrida no município de Guariba (SP), em 1984, que paralisou totalmente o corte de cana na região.

Os empresários tiveram que voltar atrás, mantendo o sistema de cinco ruas, e daí em diante as negociações anuais feitas em torno dos salários e demais condições de trabalho, pelo menos por alguns anos, foram mais favoráveis aos canavieiros (Alves, 1991). A contratação dos trabalhadores, antes feita de maneira indireta, por empreiteiros, tendeu a ser substituída pela contratação direta pelas empresas sucroalcooleiras; o transporte dos trabalhadores, feito antes em caminhões, passou a ser feito por ônibus; os empresários, com o tempo, passaram a fornecer equipamentos de proteção individual contra acidentes de trabalho.

À época, alguns empresários chegaram a expressar a intenção de adotarem amplamente a colheita mecanizada de cana-de-açúcar, até como uma

---

1 A maioria dos migrantes era constituída por pequenos agricultores na sua região de origem, sendo que aí suas atividades laborais eram menores justamente no período coincidente com a safra de cana-de-açúcar em São Paulo, possibilitando o fenômeno da migração sazonal. Ou seja, na entressafra de cana os trabalhadores permaneciam em suas regiões de origem, plantando pequenas áreas de lavouras temporárias, e na safra dirigiam-se aos canaviais paulistas para o trabalho de corte (Zocoller; Baccarin; Gebara, 1984).

forma de pressão nas negociações trabalhistas. Como se verá logo adiante, tal intenção não se efetivou, de forma ampla, pelo menos até o final da década de 1990.

No campo ambiental, a partir do final da década de 1980, acentuaram-se as mobilizações sociais e as ações do Ministério Público procurando impedir a prática das queimadas. Nessa direção, foram editadas novas normas públicas, de âmbito federal e paulista, estipulando a eliminação gradativa da queima dos canaviais. Em São Paulo, após várias tentativas de normatização mais rígidas, editou-se a lei 11.242, de 19.9.2002 que estabelece que a extinção da queima dos canaviais deva ocorrer até 2031, em áreas não mecanizáveis (declividade acima de 12%), e até 2021, em áreas mecanizáveis (declividade abaixo de 12%). Por sua vez, o decreto federal n.2.661, de 8.7.1998, trata apenas das áreas mecanizáveis e estabelece o ano de 2018 como prazo para extinção completa da queima dos canaviais (Paes, 2007).

O prazo relativamente longo estabelecido na legislação para o fim da queima dos canaviais guardava correspondência com o debate social que se desenvolvia em torno do assunto, no final da década de 1990. Do lado dos defensores da queimada, o argumento mais usado era que apenas com tal prática se garantia a colheita manual de cana e a manutenção de milhares de empregos rurais. Se a cana tivesse que ser colhida sem queimar, necessariamente, teriam que ser usadas colhedoras mecânicas, cada uma substituindo de oitenta a cem cortadores, provocando grande dispensa destes.

Esse argumento era apenas parcialmente verdadeiro. Primeiro, por que a cana sem queimar ou crua pode ser cortada manualmente, embora, como já visto, em ritmo muito menor que a cana queimada e, provavelmente, com oposição dos trabalhadores que há muitos anos vinham colhendo cana queimada. O mais importante, contudo, é que muitas vezes se praticava a queimada da cana (agredindo o meio ambiente) e se colhia mecanicamente (provocando desemprego), posto que várias colhedoras da época apresentavam dificuldades de operar com o excesso característico de palha da cana-de-açúcar.

Estimativas apresentadas por Paes (*ibidem*) apontam que a área colhida com colhedoras no estado de São Paulo era de apenas 18% da área total com cana, em 1997. Em termos da gestão empresarial, pode-se especular que este nível baixo de mecanização estava associado às dificuldades financeiras e de investimento de grande parte das empresas sucroalcooleiras na



década de 1990, a custos ainda relativamente mais baixos da colheita manual, à falta de adaptação dos canaviais (especialmente o comprimento dos talhões de cana) e das cultivares para emprego mais eficiente das colhedoras mecânicas, bem como ao insuficiente desenvolvimento tecnológico dessas máquinas.

É importante reter outro dado levantado por Paes (ibidem) sobre 1997. Nesse ano, da área colhida com colhedora, em 79% usava-se a queima prévia dos canaviais e apenas em 21% colhia-se cana crua.

A partir dessas informações e supondo que o corte manual de cana sem queimar era residual, pode se estabelecer que, em 1997, o sistema de corte manual de cana queimada representava 82%, o corte mecânico de cana queimada, 14%, e o corte mecânico de cana sem queimar representava tão somente 4% da área colhida de cana-de-açúcar, em São Paulo. Ou seja, continuava amplamente predominante o corte manual de cana queimada e o pouco de mecanização que se adotava tinha efeito muito reduzido na diminuição dos problemas ambientais associados à queimada.

Na década inicial do século XXI registraram-se vários acontecimentos favoráveis no mercado de álcool e de açúcar, estimulando o crescimento da produção sucroalcooleira (Bacarin; Alves; Gomes, 2008). A capitalização das empresas aumentou, com obtenção de consideráveis financiamentos junto ao Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), via mercado de capitais e com a entrada de novos grupos no setor, muitos internacionais. Também, a exportação do álcool combustível tornou-se efetiva, trazendo novas exigências quanto à certificação de conformidade técnica e ambiental do produto.

Nesse período constatou-se que as mudanças tecnológicas no cultivo da cana-de-açúcar se aceleraram. Em 2006, a área de cana colhida mecanicamente em São Paulo se elevava para 40%, sendo que deste total 27% continuava empregando a queimada prévia e 73% já não usava a prática (Paes, 2007). Ou seja, o corte manual de cana queimada continuava predominando, com participação de 60%, embora de forma bem menos expressiva que em 1997. No entanto, o corte mecânico de cana queimada caíra para 11% e o corte mecânico de cana sem queimar se elevava para 29% do total da área colhida com cana em São Paulo.

Dados de imagem de satélite obtidos pelo Projeto Canasat e trabalhados por Aguiar, Rudorff e Silva (2010) indicam que, na safra 2006/07, 34,2%

da área colhida com cana em São Paulo não utilizou a queima prévia, valor próximo ao obtido a partir dos dados de Paes (2007).

Entre 2006 e 2007, aparentemente, ocorreu modificação na atitude e no discurso empresarial quanto à adoção da colheita mecânica. Antes, procurava-se justificar o alto nível de área de cana queimada associando-o à manutenção da ocupação dos cortadores de cana. A partir daí, passou-se a destacar a necessidade de se adotarem práticas preservacionistas, revelando a intenção de acelerar ainda mais a adoção do corte mecânico de cana sem queimar. Nesse momento, em torno de 25% da produção brasileira de álcool combustível já era destinada à exportação.

Um fato que comprova essa mudança de atitude e discurso é a assinatura, em 2007, do Protocolo Agroambiental entre a União da Indústria de Cana-de-açúcar (Unica) e as Secretarias Estaduais do Meio Ambiente e da Agricultura e Abastecimento, prevendo-se a antecipação do final das queimadas da cana-de-açúcar em São Paulo para 2014, em áreas mecanizáveis, e para 2017, em áreas não mecanizáveis. Embora a adesão ao protocolo fosse (e continua sendo) voluntária, sua edição deixava clara a opção, pelo menos das lideranças dos empresários paulistas, em extinguir, o quanto antes, as queimadas (Fredo et al., 2008).

A aceleração da adoção da colheita mecânica é, indiretamente, comprovada pelo estudo de Aguiar, Rudorff e Silva (2010). Se em 2006/07 a área colhida com cana sem queimar em São Paulo atingira 34,2% do total colhido, em 2007/08 esse valor passou para 46,6%, e em 2008/09 para 49,1%, alcançando 55,7% em 2009/10.<sup>2</sup> Ou seja, nesse último ano a área colhida sem queima prévia do canavial tornou-se levemente majoritária.

Supondo-se que a substituição do corte mecânico de cana queimada por corte mecânico de cana crua, entre 2006 e 2009, tenha se mantido no ritmo constatado por Paes (2007) entre 1997 e 2006, pode-se estimar, a partir dos dados de Aguiar, Rudorff e Silva (2010) que, em 2009, 61,7% da área colhida com cana em São Paulo usou colheita mecânica, sendo 6,0% precedida da queima dos canaviais.

---

2 Estudo desenvolvido por Ramos (2007) aponta para a intensificação do uso de colhedoras, sendo que, em 2003, foram vendidas no Brasil quarenta dessas máquinas, saltando para 254, em 2006, e prevendo-se que seriam comercializadas entre 950 e mil unidades, em 2010. O autor estima que 80% da área de cana-de-açúcar no Centro-Sul do Brasil serão colhidos mecanicamente, em 2015.

O efeito negativo da incorporação mais acelerada da colheita mecânica sobre o número de trabalhadores canavieiros vem sendo reforçado pelo acréscimo da produtividade média do cortador de cana, verificado desde o final da década de 1980. Assim, dados coletados pelo Instituto de Economia Agrícola (IEA) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo mostram que, em 1989, o trabalhador canavieiro cortava, em média, 6,09 toneladas de cana por dia em São Paulo. Este valor passou para 7,00 toneladas, em 1995, 7,69 toneladas, em 2000, até alcançar, em 2009, 8,79 toneladas (IEA, 2008, 2009). Ou seja, em um prazo de vinte anos, a produtividade média do canavieiro no corte de cana, em São Paulo, aumentou em 44,3%.

Além da colheita, realizada entre os meses de abril e novembro nas condições paulistas, outra operação agrícola em que se observam modificações tecnológicas importantes é o plantio de cana-de-açúcar, realizado, normalmente, nos quatro primeiros meses do ano (Baccarin; Gebara, 2010). Neste caso já se constata a substituição do plantio manual pelo plantio mecânico em algumas empresas. Também aumentou o número de cortes de um mesmo canavial, de uma média de três, comum na década de 1970, para uma média superior a seis, atualmente. Ou seja, em uma mesma área de cana-de-açúcar, o plantio tende a se repetir, nos dias atuais, a cada sete anos ou mais, contra os quatro anos da década de 1970, reduzindo a necessidade de trabalhadores por área de cana-de-açúcar.

## Metodologia

Os dados da área de cana-de-açúcar no estado de São Paulo foram obtidos do Projeto Canasat do Inpe. Os da produção de cana-de-açúcar, de açúcar e álcool foram obtidos de publicações da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab).

Já a fonte de informações sobre ocupação foram os arquivos do Ministério do Trabalho e Emprego (MTE) do Governo Federal do Brasil, que registram informações sobre ocupação formal (com carteira de trabalho assinada) prestadas pelas próprias empresas empregadoras. É importante ressaltar que nas condições prevalecentes no estado de São Paulo, Moraes (2004) estimava que a ocupação formal representava, aproximadamente,

90% da ocupação sucroalcooleira. Como de lá para cá a formalidade de trabalho em geral tendeu a aumentar no Brasil, entende-se que algo semelhante deve ter acontecido no setor aqui analisado, aumentando ainda mais a já alta representatividade dos dados analisados nesse trabalho.

As empresas enviam dois tipos de relatório ao MTE. Um, chamado de Relação Anual de Informações Sociais (Rais), tem dados de ocupação em 31 de dezembro de cada ano. O outro tipo é de relatórios que registram, para cada mês do ano, a movimentação (admissão e demissão) das pessoas ocupadas, chamado de Cadastro Geral de Empregados e Desempregados (Caged). A partir das informações da Rais de um ano qualquer, pode-se obter uma estimativa do número de pessoas ocupadas em determinado mês do ano seguinte, agregando-se o número de admissões e demissões registrado até então pelo Caged.

Para as empresas sucroalcooleiras é necessário não se ater apenas aos dados registrados na Rais, cujas informações coincidem com a entressafra do setor, quando as agroindústrias não estão mais processando a cana-de-açúcar e as atividades agrícolas são menores. É imprescindível que também se usem os dados do Caged, que permitem obter informações dos meses da safra sucroalcooleira, cujo ápice ocorre entre maio e julho de cada ano.

Em um primeiro momento, fez-se uma análise da ocupação de acordo com o tipo de empresa. Consideraram-se como empresas sucroalcooleiras aquelas classificadas na Rais e no Caged nos seguintes grupos: cultivo da cana-de-açúcar, fabricação do açúcar em bruto, fabricação do açúcar refinado e fabricação de álcool.

É preciso observar que essa classificação se estabelece de acordo com a atividade principal da empresa, sendo que uma empresa classificada como de cultivo da cana-de-açúcar, por exemplo, pode se dedicar também a outras atividades agropecuárias ou mesmo não agropecuárias. Outra observação é que no Brasil há grande integração vertical nas agroindústrias sucroalcooleiras (produtoras de açúcar e álcool) que produzem, diretamente, grande parte de sua matéria prima, a cana-de-açúcar.<sup>3</sup> Dessa forma pressupõe-se

---

3 Na safra 2007/08, constatou-se que nas agroindústrias sucroalcooleiras do Centro-Sul, onde se encontra São Paulo, 65,4% da cana-de-açúcar moída era proveniente de canaviais das próprias usinas ou destilarias e apenas 34,6% provinha de fornecedores independentes (Conab, 2008).

que o número de pessoas ocupadas em atividades agrícolas nas empresas dedicadas à fabricação do açúcar em bruto, do açúcar refinado ou do álcool seja significativo, embora menos importante que no caso das empresas dedicadas ao cultivo de cana-de-açúcar.

A análise dos resultados foi feita comparando-se o ocorrido isoladamente em empresas do cultivo de cana-de-açúcar com o acontecido no conjunto dos outros três tipos de empresas sucroalcooleiras, que será chamado de agroindústrias sucroalcooleiras. As empresas do primeiro tipo são de menor tamanho médio, sendo que 6.258 delas apareceram registradas na Rais 2009. Já as agroindústrias sucroalcooleiras são, na média, de maior porte, com 258 registros na Rais 2009 (MTE, 2011).

Em um segundo momento, analisou-se a evolução das diferentes categorias profissionais registradas nas empresas sucroalcooleiras. Para tanto, considerou-se o nível de classificação família ocupacional, conforme a Classificação Brasileira de Ocupações (CBO).<sup>4</sup> Foi constatada a existência de 380 famílias ocupacionais nas empresas sucroalcooleiras.

De acordo com a experiência acumulada pelos autores deste trabalho, essas famílias foram organizadas nos seguintes grupos: pessoas ocupadas na agricultura, pessoas ocupadas na indústria (usinas ou destilarias), pessoas ocupadas em atividades administrativas e de apoio (escritórios, manutenção etc.) e pessoas ocupadas em atividades não sucroalcooleiras.

A seguir subdividiu-se o grupo de pessoas ocupadas na agricultura em três subgrupos: trabalhadores canavieiros não qualificados, trabalhadores da mecanização agrícola e outras pessoas ocupadas na agricultura. O primeiro subgrupo resulta da soma de três famílias ocupacionais, quais sejam, trabalhadores agropecuários em geral, trabalhadores de apoio à agricultura e trabalhadores agrícolas na cultura de gramíneas, e entende-se que aí estão incluídos os trabalhadores que se dedicam às atividades que não exigem

---

4 A CBO foi instituída pela Portaria Ministerial n.397, em 2002, e tem por finalidade a identificação das ocupações no mercado de trabalho, para fins classificatórios junto a registros administrativos e domiciliares. Ela classifica as ocupações em quatro grupos. O grande grupo ocupacional constitui o nível mais agregado da classificação. O subgrupo ocupacional principal busca melhorar o equilíbrio hierárquico entre o número de grandes grupos e subgrupos. O subgrupo ocupacional indica o domínio dos campos profissionais de famílias ocupacionais agregadas. E a família ocupacional contempla 596 grupos de base, que agrupam situações de emprego ou ocupações similares (MTE, 2009).

maior qualificação profissional, como o plantio e o corte de cana-de-açúcar. O segundo subgrupo constitui uma família ocupacional específica da CBO e o terceiro resulta da soma das demais famílias ocupacionais observadas na lavoura canavieira.

Em algumas análises só se consideraram dois grupos de pessoas ocupadas nas empresas sucroalcooleiras, o dos trabalhadores canavieiros não qualificados e o conjunto dos demais tipos de ocupação, que foi denominado de outras ocupações sucroalcooleiras.

Para os trabalhadores canavieiros não qualificados, além da variação de seu número entre os anos considerados, fez-se uma análise de sua variação entre os meses do ano, procurando captar eventuais mudanças na sazonalidade de emprego.

Por fim, comparou-se a evolução do número das diferentes categorias de ocupação com a evolução da área de cana-de-açúcar e com a produção de cana-de-açúcar, açúcar e álcool.

A opção de considerar para a análise apenas o período posterior a 2007 justifica-se por duas razões: houve mudança na metodologia da Rais do Caged em 2006, dificultando a comparação dos anos mais recentes com os anteriores a 2006, e entende-se também que em 2007 os empresários sucroalcooleiros explicitaram claramente a intenção de generalizar, em poucos anos, o corte mecânico de cana sem queimar, dando maior intensidade à modernização tecnológica da lavoura canavieira.

## Resultados

### Ocupação por tipo de empresa

Fica evidenciada na Tabela 22.1 queda de 19% na média anual de pessoas ocupadas em empresas do cultivo da cana-de-açúcar de 2007 a 2010. O número médio de pessoas ocupadas nas chamadas agroindústrias sucroalcooleiras cresceu 15% no período todo, embora tenha ficado praticamente estagnado entre 2008 e 2009, muito provavelmente devido à crise econômica deste último ano. Para o conjunto de empresas sucroalcooleiras houve pequena diminuição no número médio de pessoas ocupadas, de 316.121, em 2007, para 310.413, em 2010, ou 2% a menos.

Tabela 22.1 – Número médio de pessoas ocupadas em diferentes empresas sucroalcooleiras, estado de São Paulo, 2007 a 2010

Tipo de Empresa	Item	2007	2008	2009	2010
Cultivo da Cana-de-açúcar	Valor	156.682	147.891	137.575	126.378
	Índice	100	94	88	81
Agroindústria Sucroalcooleira	Valor	159.439	172.803	173.640	184.035
	Índice	100	108	109	115
Empresas Sucroalcooleiras	Valor	316.121	320.694	311.215	310.413
	Índice	100	101	98	98

Fonte: MTE (2011)

A queda da ocupação nas empresas do cultivo da cana-de-açúcar, enquanto crescia a ocupação nas agroindústrias sucroalcooleiras, a princípio, poderia decorrer da diminuição do número das empresas do primeiro grupo em relação ao segundo grupo. Contudo, isso, de fato, não ocorreu, sendo que o número de empresas do cultivo de cana-de-açúcar aumentou de 6.010, em dezembro de 2007, para 6.258, em dezembro de 2009. Com as agroindústrias sucroalcooleiras aconteceu o contrário, uma diminuição no período considerado, de 268 para 258 empresas (MTE, 2011), apontando para a intensificação da concentração econômica setorial (Baccarin, Gebara; Rosada, 2009).

Outra provável explicação, que se confirma nas análises posteriores, é que, como nas empresas do cultivo da cana-de-açúcar a importância das ocupações agrícolas é maior que nas agroindústrias sucroalcooleiras, é justamente nas empresas do primeiro grupo que se refletem com maior força as atuais mudanças tecnológicas na colheita da cana-de-açúcar, resultando na dispensa de trabalhadores rurais.

## Ocupação por categorias profissionais

As atividades sucroalcooleiras têm forte sazonalidade ao longo do ano. Há um período de safra, em que ocorre a colheita da cana-de-açúcar e seu concomitante processamento industrial que, nas condições paulistas, tende a se estender entre os meses de abril e novembro, com ápice entre maio e julho. Já a entressafra, em que ocorrem atividades como o plantio da cana-de-açúcar e a manutenção de máquinas e equipamentos industriais, dura de dezembro de determinado ano a março do ano seguinte. O final de dezembro costuma registrar o menor nível de ocupação sucroalcooleira. Dada essa

característica as análises a seguir consideram a situação do mês de junho e a do mês de dezembro.<sup>5</sup>

Observa-se, na Tabela 22.2, que o número total de pessoas ocupadas em empresas sucroalcooleiras no período de safra apresentou uma pequena queda, de 4%, entre 2007 e 2010.

Tabela 22.2 – Pessoas ocupadas em junho em empresas sucroalcooleiras, de acordo com grupos e subgrupos, estado de São Paulo, 2007 a 2010

Grupos e Subgrupos	Item	2007	2008	2009	2010
1 – Pessoas Ocupadas na Agricultura	Valor	246.616	242.423	220.209	207.674
	Índice	100	98	89	84
Trabalhadores Canavieiros não Qualificados	Valor	212.966	205.495	182.735	165.807
	Índice	100	96	86	78
Trabalhadores da Mecanização Agrícola	Valor	26.289	28.946	30.036	34.103
	Índice	100	110	114	130
Outras Pessoas Ocupadas na Agricultura	Valor	7.361	7.982	7.438	7.764
	Índice	100	108	101	105
2 – Pessoas Ocupadas na Indústria	Valor	32.938	33.263	34.586	35.984
	Índice	100	101	105	109
3 – Pessoas em Atividades Administrativas e de Apoio	Valor	76.348	82.907	85.174	93.775
	Índice	100	109	112	123
4 – Pessoas em Atividades não Sucroalcooleiras	Valor	5.970	7.566	8.684	9.053
	Índice	100	127	145	152
5 – Total	Valor	361.872	366.159	348.653	346.486
	Índice	100	101	96	96

Fonte: MTE (2011)

Entre os grupos, o das pessoas ocupadas em atividades não sucroalcooleiras cresceu 52%, embora represente menos que 3% da ocupação das empresas sucroalcooleiras. O grupo pessoas ocupadas em atividades administrativas e de apoio teve expressivo crescimento, de 23%, bem maior que o do grupo de pessoas ocupadas na indústria, de 9%.

Por sua vez, o número de pessoas ocupadas na agricultura registrou uma queda de 16%, entre junho de 2007 e junho de 2010. Isso se deveu à redução

5 Para o conjunto das ocupações sucroalcooleiras, o mês de junho foi o que registrou o maior número de pessoas ocupadas nos anos de 2007, 2008, 2010, enquanto em 2009, isso ocorreu em maio. Já o mês de dezembro registrou o menor número de ocupação também em 2007, 2008 e 2010, sendo que em 2009 o número de pessoas ocupadas em janeiro e fevereiro foi menor que o de dezembro.



do número de trabalhadores canavieiros não qualificados, de 22%, e reflete o avanço da colheita mecânica nos canaviais paulistas. Outro reflexo dessa mudança tecnológica é o crescimento expressivo, de 30%, dos trabalhadores na mecanização agrícola, entre 2007 e 2010.

Há uma mudança evidente na composição da ocupação sucroalcooleira no período da safra em São Paulo. Em 2007, as pessoas ocupadas na agricultura representavam 68,2% do total de pessoas ocupadas em empresas sucroalcooleiras no estado, valor que caiu para 59,9%, em 2010. No caso dos trabalhadores agrícolas não qualificados, esses números são, respectivamente, de 58,9% e 47,9%.

A Tabela 22.3 permite observar que na entressafra o número de trabalhadores canavieiros não qualificados sofreu uma alteração bem menos significativa, ou seja, uma queda de apenas 4%, entre 2007 e 2010. Ao mesmo tempo, houve expansão significativa no número dos trabalhadores da mecanização agrícola, bem como das pessoas ocupadas na indústria e das pessoas ocupadas em atividades administrativas e de apoio, de forma que o total de ocupação sucroalcooleira na entressafra expandiu-se em 11%, entre 2007 e 2010.

Tabela 22.3 – Pessoas ocupadas, dezembro, em empresas sucroalcooleiras, de acordo com grupos e subgrupos, estado de São Paulo, 2007 a 2010

Grupos e Subgrupos	Item	2007	2008	2009	2010
1 – Pessoas Ocupadas na Agricultura	Valor	120.867	123.411	127.060	123.288
	Índice	100	102	105	102
Trabalhadores Canavieiros não Qualificados	Valor	92.133	92.144	93.002	88.618
	Índice	100	100	101	96
Trabalhadores da Mecanização Agrícola	Valor	22.184	24.526	27.087	28.254
	Índice	100	111	122	127
Outras Pessoas Ocupadas na Agricultura	Valor	6.550	6.741	6.971	6.416
	Índice	100	103	106	98
2 – Pessoas Ocupadas na Indústria	Valor	24.190	27.650	29.404	28.869
	Índice	100	114	122	119
3 – Pessoas em Atividades Administrativas e de Apoio	Valor	66.565	74.002	79.979	81.669
	Índice	100	111	120	123
4 – Pessoas em Atividades não Sucroalcooleiras	Valor	4.115	4.243	5.048	6.638
	Índice	100	103	123	161
5 – Total	Valor	215.737	229.360	241.491	240.464
	Índice	100	106	112	111

Fonte: MTE (2011)

Pode-se estabelecer que as mudanças tecnológicas na lavoura canavieira na entressafra, especialmente na operação do plantio da cana-de-açúcar, têm resultado em efeitos negativos menos fortes sobre o nível de ocupação do que aqueles que ocorreram na safra.

Tanto na safra quanto na entressafra a ocupação na lavoura canavieira, especificamente a que não exige maior qualificação, revelou um desempenho bem abaixo dos outros tipos de ocupação, seja na indústria, seja nos escritórios. Isso pode dar uma falsa impressão de atraso tecnológico nesses dois setores quando comparados com a agricultura. Muito provavelmente, o que de fato ocorreu é que na indústria e nos escritórios as mudanças tecnológicas e administrativas foram muito contundentes e ocorreram já na década de 1990, tendo se verificado automatização e informatização de várias etapas do processo produtivo, bem como terceirização de atividades típicas de serviços. Já na agricultura as mudanças tecnológicas acentuaram-se no presente século, especialmente após 2006.

### **Sazonalidade de ocupação dos trabalhadores canavieiros não qualificados**

A Tabela 22.4 evidencia a queda no número médio de trabalhadores canavieiros não qualificados ao longo dos quatro anos de análise. Em termos absolutos essa diminuição atingiu 37.734 trabalhadores. Considerando-se o estado de São Paulo o número é pouco expressivo diante do total de pessoas nele ocupadas. Contudo, tal situação pode apresentar repercussão social mais forte de maneira localizada, em municípios em que a ocupação sucroalcooleira representa grande parte da sua ocupação total. Também pode estar influenciando o fluxo de migração sazonal para os canaviais paulistas.

Também fica evidenciada a diminuição da sazonalidade de ocupação dos trabalhadores canavieiros não qualificados, entre 2007 e 2010. Assim, no mês de maio (o de maior ocupação) de 2007 o número desses trabalhadores superava em 132% o seu número em dezembro (o de menor ocupação) do mesmo ano. Ano a ano foi se observando redução nessa relação, até se atingir 88%, em 2010. Embora em queda, a sazonalidade se mantém ainda muito alta.

O número de trabalhadores canavieiros não qualificados praticamente permaneceu constante nos meses de dezembro de 2007, 2008 e 2009 e apresentou pequena queda de 4% em 2010, em comparação a 2007. Já entre maio de 2007 e maio de 2010, a diminuição do número desses trabalhadores

Tabela 22.4 – Número de trabalhadores canavieiros não qualificados, mês a mês, de 2007 a 2010, estado de São Paulo

Mês	2007		2008		2009		2010	
	Número	Índice	Número	Índice	Número	Índice	Número	Índice
Jan.	121.183	132	107.202	116	95.233	102	95.116	107
Fev.	147.704	160	133.831	145	105.931	114	110.278	124
Mar.	165.461	180	152.807	166	143.142	154	142.949	161
Abr.	194.655	211	195.870	213	178.593	192	162.205	183
Mai	213.753	232	206.723	224	185.718	200	166.408	188
Jun.	212.966	231	205.495	223	182.735	196	165.807	187
Jul.	207.111	225	200.672	218	177.824	191	163.272	184
Ago.	205.150	223	195.828	213	174.575	188	160.055	181
Set.	203.919	221	192.324	209	173.115	186	156.094	176
Out.	198.658	216	189.571	206	171.678	185	148.630	168
Nov.	175.630	191	179.094	194	168.439	181	126.082	142
Dez.	92.133	100	92.144	100	93.002	100	88.618	100
Média	178.194		170.963		154.165		140.460	

Fonte: MTE (2011)

foi de 22%. Portanto, pode-se estabelecer que a diminuição da sua sazonalidade de ocupação se deveu à redução da quantidade de emprego disponível na safra canavieira, em face do avanço do corte mecânico de cana-de-açúcar.

## Indicadores de ocupação e de produção sucroalcooleira

Os indicadores da Tabela 22.5 mostram que, entre 2007 e 2010, a produção do álcool cresceu 16%, do açúcar e da cana-de-açúcar 21% e da área cultivada com cana-de-açúcar cresceu 25% no estado de São Paulo.

Tabela 22.5 – Indicadores de ocupação e produção sucroalcooleira, estado de São Paulo, 2007 a 2010

Grupos e Subgrupos	Item	2007	2008	2009	2010
Área Cultivada (1.000 ha)*	Valor	4.249,9	4.873,9	5.242,5	5.303,3
	Índice	100	115	123	125
Produção de cana (1.000 t)	Valor	297.135,7	345.465,4	362.664,7	359.235,5
	Índice	100	116	122	121

Continua

Tabela 22.5 – *Continuação*

Grupos e Subgrupos	Item	2007	2008	2009	2010
Produção de açúcar (1.000 t)	Valor	19.428,6	20.186,7	20.815,8	23.572,8
	Índice	100	104	107	121
Produção de álcool (milhão l)	Valor	13.351,3	16.897,8	14.918,5	15.489,2
	Índice	100	127	112	116
Trab. Canavieiros não Qualificados (média anual)	Valor	178.194	170.963	154.165	140.460
	Índice	100	96	87	79
Outras Ocupações Sucroalc. (média anual)	Valor	137.928	149.731	157.052	169.953
	Índice	100	109	114	123
Total Ocupação Sucroalc. (média anual)	Valor	316.121	320.694	311.215	310.413
	Índice	100	101	98	98

\* Inclui áreas em que o canavial está sendo reformado

Fonte: Conab (2011), Inpe (2011), Mte (2011)

Ao mesmo tempo, a ocupação total sucroalcooleira apresentou pequeno decréscimo de 2%, não acompanhando o crescimento da produção setorial. Contudo, nota-se que, isoladamente, a categoria de outras ocupações sucroalcooleiras apresentou crescimento semelhante ao da produção sucroalcooleira. Enquanto isso, o número médio dos trabalhadores canavieiros não qualificados decrescia em 21%, entre 2007 e 2010.

## Considerações finais

No período de análise, de 2007 a 2010, as mudanças tecnológicas no cultivo da cana-de-açúcar apresentaram maior alcance e consequências quanto ao nível de ocupação do que aquelas ocorridas em outras etapas do processo produtivo sucroalcooleiro, nos escritórios e na transformação industrial.

Especificamente, houve aceleração da introdução do corte mecânico de cana sem queimar que, em 2010, já predominava nos canaviais paulistas, substituindo o corte manual de cana queimada, que se mostrava amplamente majoritário no final dos anos 1990.

Muito provavelmente, o corte de cana mecânico já apresenta custos de produção relativos menores (ou, no mínimo, semelhantes) que o corte manual e os canaviais e cultivares de cana usadas no estado de São Paulo estão mais adaptados à colheita mecanizada.

O fato de substituir o corte manual de cana queimada por corte mecânico de cana sem queimar e não pelo corte mecânico de cana queimada indica que as questões ambientais estão sendo levadas em conta nas tomadas de decisão dos empresários sucroalcooleiros. Mais do que a existência de uma legislação específica sobre a queimada dos canaviais, tal procedimento está relacionado com a estratégia empresarial de firmar uma imagem, em âmbito mundial, de que o setor produz um combustível que, além de renovável, agrediria pouco o meio ambiente.

Em termos dos postos de trabalho, as recentes mudanças tecnológicas têm feito com que, apesar do significativo crescimento da produção de açúcar, álcool e cana-de-açúcar, o nível de ocupação nas empresas sucroalcooleiras em São Paulo tenha se apresentado praticamente estagnado entre 2007 e 2010.

Mais especificamente, enquanto crescia o nível das outras ocupações sucroalcooleiras, o número de trabalhadores canavieiros não qualificados, em que estão incluídos os cortadores de cana, decrescia em valor semelhante.

Nas ocupações agrícolas, a diminuição relativa do número de trabalhadores canavieiros não qualificados foi menos intensa que o aumento do número de trabalhadores na mecanização agrícola. Contudo, em termos absolutos, aquela queda revelou-se bem mais significativa que esse aumento.

Está ocorrendo uma evidente e acelerada alteração na composição da ocupação sucroalcooleira, com diminuição da importância daquelas ocupações que exigem menor grau de qualificação profissional em favor das com maior qualificação. A partir disso, supõe-se que tanto as empresas quanto o poder público estejam desenvolvendo ações em favor da requalificação profissional de egressos do corte manual de cana.

A sazonalidade de ocupação dos trabalhadores canavieiros não qualificados apresentou uma diminuição no período analisado. Entretanto, ela continua muito alta, sendo que o número desses trabalhadores contratados, em maio de 2010, suplantou em 88% o seu número em dezembro do mesmo ano.

A partir dos resultados e análises aqui apresentadas, sugerem-se alguns aprofundamentos ou detalhamentos e derivações para futuras pesquisas.

Quanto ao primeiro ponto, seria interessante checar junto aos Departamentos de Recursos Humanos de empresas sucroalcooleiras se os grupos e subgrupos das famílias ocupacionais aqui considerados estão bem delimi-

tados. Também, sugere-se que se faça cruzamento entre o tipo de empresa sucroalcooleira e seus respectivos grupos e subgrupos ocupacionais.

Dentro do segundo grupo de sugestões, está a de se desagregar a análise para o nível municipal, verificando prováveis diferenças e repercussões locais das atuais mudanças na ocupação sucroalcooleira. Outra linha de pesquisa seria analisar os efeitos qualitativos e quantitativos da diminuição dos trabalhadores canavieiros não qualificados na migração sazonal para a colheita de cana. Também se sugere procurar explicações para o grande crescimento observado nas ocupações administrativas e de apoio nas empresas sucroalcooleiras, bem como se propõe que se verifique a existência de programas de requalificação e recolocação profissional, sob encargo dos empresários ou do poder público, que atendam especificamente os trabalhadores canavieiros não qualificados.

## Referências bibliográficas

- AGUIAR, D. A.; RUDORFF, B. F. T.; SILVA, W. F. *Monitoramento do modo de colheita da cana-de-açúcar no estado de São Paulo – ano safra 2009/2010*. São José dos Campos: Inpe/MCT, 2010. 154 p. (Relatório técnico 16685-RPQ/851).
- ALVES, F. J. C. *Modernização da agricultura e sindicalismo: as lutas dos trabalhadores assalariados rurais na região canavieira de Ribeirão Preto*. Campinas (SP), 1991. 270 p. Tese (Doutoramento) – IE/Unicamp.
- BACCARIN, J. G.; ALVES, F. J. C. & GOMES, L. F. C. Emprego e condições de trabalho dos canavieiros no Centro-Sul do Brasil, entre 1995 e 2007. In: XLVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 2008, Rio Branco (AC). *Anais...* Brasília: Sober, 2008. 1 CD-ROM.
- BACCARIN, J. G.; GEBARA, J. J. Intensificación del ritmo y reducción de los puestos de trabajo de los trabajadores cañeros en el estado de São Paulo, Brasil In: VI CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE SOCIOLOGÍA DEL TRABAJO, 2010, México. *Anais...* 2010.
- BACCARIN, J. G.; GEBARA, J. J.; ROSADA, A. A. Avanço recente da concentração econômica sucroalcooleira no Centro-Sul do Brasil. *Cadernos CERU* (USP), v.20, p.87-102, 2009.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). *Perfil do setor de açúcar e álcool no Brasil – situação observada em novembro 2007 a abril 2008*. Brasília: CONAB, 2008. 75p.
- . *Levantamentos de safras*. Brasília, CONAB, 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: março de 2011.

- FREDO, C. E. et al. Índice de mecanização na colheita da cana-de-açúcar no estado de São Paulo e nas regiões produtoras paulistas, junho de 2007. *Análise e Indicadores do Agronegócio*, São Paulo, v.3, n.3, março 2008. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br>. Acesso em: março de 2008.
- GEBARA, J. J.; BACCARIN, J. G. Alteração no sistema de corte de cana, de 5 para 7 ruas: implicações para produtores e trabalhadores. *Boletim Paulista de Geografia*, 60: 45-56, São Paulo, 2º. Sem. 1983/1º. Sem. 1984.
- IEA (Instituto de Economia Agrícola). *Informações estatísticas da agricultura*. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br>. Acesso em: março de 2008.
- IEA. *Informações estatísticas da agricultura*. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br>. Acesso em: novembro de 2009.
- INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais). *Projeto CANASAT – mapeamento da cana via imagens de satélite de observação da terra*. Disponível em: <http://www.dsr.inpe.br/laf/canasat/>. Acesso em: março de 2011.
- MORAES, M. A. F. D. Mercado de trabalho do setor de açúcar e álcool: desafios atuais e perspectivas futuras. 2004. WORKSHOP MERCADO DE TRABALHO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO – desafios e perspectivas futuras. *Anais...* Piracicaba: ESALQ, 2004, 11p.
- MTE (Ministério do Trabalho e Emprego). *Classificação brasileira de ocupações*. Disponível em: <http://www.mtecbo.gov.br>. Acesso em: novembro de 2009.
- \_\_\_\_\_. *Programa de disseminação de estatísticas do trabalho*. Disponível em: <http://www.mte.gov.br>. Acesso em: fevereiro de 2011.
- PAES, L. A. D. Áreas de expansão do cultivo da cana. In: MACEDO, I. de C. (Org.). *A energia da cana-de-açúcar – doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e sua sustentabilidade*. 2.ed. São Paulo: Unica, 2007. p.125-33.
- RAMOS, P. O futuro da ocupação na agroindústria canavieira do Brasil: uma discussão dos trabalhos disponíveis e um exercício de estimação. *Informações Econômicas*, São Paulo, v.37, n.11, p.69-75, 2007.
- ZOCOLLER, M. M.; BACCARIN, J. G.; GEBARA, J. J. O processo de intermediação de mão-de-obra e qualidade de vida do trabalhador volante na região de Jaboticabal. *Boletim Paulista de Geografia*, v.60, p.78 - 95, 1984.

## 23

# Potenciais riscos ambientais do biodiesel

*Lilian Nogueira,  
Eduardo Alves de Almeida*

### Introdução

Os combustíveis derivados do petróleo, responsáveis por gerar efeitos prejudiciais ao ambiente, estão gradativamente sendo substituídos por fontes de energia renováveis e menos poluentes. Um exemplo disso é o biodiesel, uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos derivados de gordura animal e óleos vegetais, que vem se apresentando como uma alternativa ao uso do óleo diesel.

Muitos estudos demonstram que o biodiesel é mais biodegradável (Pasqualino; Montané; Salvadó, 2006; Prince; Haitmanek; Lee, 2008) e produz menos matéria particulada e gases tóxicos e de efeito estufa durante a queima que o óleo combustível derivado de petróleo (Lee; Herage; Young, 2004; Balat; Balat, 2010) (Tabela 23.1), sendo mais amigável para a atmosfera, apesar de que alguns trabalhos mostram que as emissões de óxidos de nitrogênio e de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) específicos como fenantreno, etil e trimetil benzenos aumentam em misturas de biodiesel com diesel de petróleo (Corrêa; Arbilla, 2006).

Mas apesar de o biodiesel ser ecologicamente mais limpo em comparação ao diesel derivado de petróleo, o incremento de sua produção pode acarretar em potenciais riscos ambientais que não são ainda totalmente claros, necessitando-se de mais estudos relacionados. O aumento em si da produ-



Tabela 23.1 – Médias das emissões de biodiesel puro B100 (biodiesel 100 %) e da mistura B20 (20 % biodiesel/80 % petrodiesel) em relação às emissões geradas pela queima do óleo diesel

Emissões	B20	B100
Monóxido de carbono	-12 %	-48 %
Hidrocarbonetos totais não queimados	-20 %	-67 %
Matéria particulada em suspensão	-12 %	-47 %
Óxidos de nitrogênio	2 %	10 %
Sulfatos	-20 %	-100 %
Compostos tóxicos no ar	-12 a -20 %	-60 a -90 %

Fonte: Lotero et al. (2006); Balat; Balat (2010)

ção vegetal como fonte para a produção do biodiesel pode ser um ponto de preocupação, visto que incrementos da demanda pelo biodiesel significam necessidade de ampliações nas áreas de plantio, com efeitos diretos ao meio ambiente, em função do aumento no uso de intensivos agrícolas e desmatamento para expansões das áreas de cultivo.

## Efeitos adversos do biodiesel sobre a saúde de organismos vivos

No que se refere aos efeitos adversos da exposição de organismos vivos ao biodiesel, tem-se mostrado também que o biodiesel é muito menos nocivo que o diesel de petróleo, sendo que a toxicidade do diesel também diminui na medida em que a porcentagem de biodiesel em misturas aumenta. Por exemplo, Ackland et al. (2007) demonstraram que cultivos de células do trato respiratório humano expostos a diesel contendo 20% de biodiesel apresentaram uma diminuição em 52% nos níveis de alterações nucleares, em comparação àquelas que foram expostas ao diesel puro. As que foram expostas a diesel contendo 80% de biodiesel tiveram apenas 16% das alterações apresentadas em comparação a células expostas a diesel puro.

O óleo diesel é uma mistura complexa que consiste principalmente em hidrocarbonetos olefínicos, parafínicos e aromáticos (Vieira et al., 2007). Muitos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) presentes na composição desse combustível são considerados carcinogênicos pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (Iarc) (Zhu et al., 2008). Quando

comparamos a presença dessas substâncias tóxicas nos combustíveis, podemos observar que o biodiesel não possui HPA em sua composição, ao contrário do óleo diesel (Nogueira et al., 2011). Dessa forma, é esperado que o óleo diesel seja mais prejudicial aos organismos que o biodiesel, o que explica os resultados de menor toxicidade para organismos expostos.

Atividades urbanas e industriais promovem a deposição de HPA nos ecossistemas e vazamentos de petróleo ou acidentes com caminhões tanque cheios de combustíveis ajudam a agravar esse quadro (Hamouten et al., 2002; Silva et al., 2009). Com o aumento da utilização do biodiesel e de suas misturas com o óleo diesel, esses tipos de acidentes agora podem resultar na deposição de compostos derivados do biodiesel nesses ambientes. Porém, apesar de o biodiesel ser comprovadamente menos tóxico, ele também apresenta riscos, e existem poucos estudos ainda referentes à caracterização completa dos elementos presentes em diferentes composições de biodiesel ou à toxicidade potencial de muitos desses elementos à biota.

Ainda que não apresente concentrações relevantes de HPA, diversos outros compostos de toxicidade desconhecida podem estar presentes na composição do biodiesel, sejam elementos naturais derivados da fonte usada para sua síntese, sejam compostos utilizados durante sua produção, para catalisar de forma eficaz as reações necessárias para dar origem ao biodiesel. Além disso, diversos aditivos usados na produção do biodiesel podem também apresentar efeitos adversos à biota.

Sabe-se, por exemplo, que muitos tipos de biodiesel propiciam ambientes favoráveis para o desenvolvimento de microorganismos, fazendo com que colônias desses seres se estabeleçam e se desenvolvam durante períodos de estocagem, trazendo assim potenciais prejuízos para seu uso em motores, como por exemplo, o entupimento de filtros, comprometendo assim o desempenho do combustível. Nesse sentido, a adição de certos biocidas no biodiesel tem sido prática comum em diversos países, para evitar a proliferação de microorganismos. Dentre esses biocidas, temos como exemplos a 5-cloro-2-metil-4-isotiazolinona e a 2-metil-4-tiazolinona, sendo que há estudos indicando que o primeiro apresenta diversos efeitos prejudiciais para células de defesa do sistema imunológico do pulmão de ratos (Poon et al., no prelo).

Os biocidas são apenas um dos exemplos dos diversos aditivos usados no biodiesel, e um dos poucos que foram estudados. Segundo Swanson,

Madden e Ghio (2007), além dos biocidas, o biodiesel pode levar como aditivos supressores de fumaça, diminuidores de pontos de névoa, detergentes, anticongelantes, antioxidantes, metais etc., cujos efeitos prejudiciais não foram ainda estudados em organismos vivos expostos. Além disso, esses autores afirmam que o biodiesel pode conter altas concentrações de aldeídos tóxicos, que podem prejudicar a saúde humana. Por exemplo, um dos subprodutos da produção do biodiesel, o glicerol, pode gerar acroleína com alto rendimento (Figura 23.1), um aldeído comprovadamente carcinogênico (Mota; da Silva; Gonçalves, 2009; Liu; Zhu; Xie, 2010), após a queima. Apesar de ser extraído do biodiesel antes de ir para o mercado, quantidades residuais do glicerol podem permanecer na composição do biodiesel.

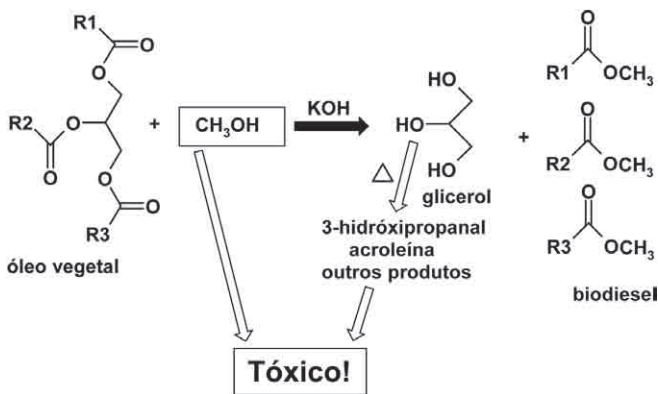


Figura 23.1 – Produção de biodiesel a partir da transesterificação de óleos vegetais e geração de potenciais resíduos tóxicos

Khan, Warith, e Luk (2007) conduziram experimentos a fim de avaliar a toxicidade aguda do óleo diesel, biodiesel puro e das misturas entre os dois compostos B5, B20 e B50 (5, 20 e 50 % de biodiesel em diesel de petróleo, respectivamente) em larvas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e microcrustáceos (*Daphnia magna*). Nesse estudo foi observado que, em ambas as espécies testadas, à medida que a porcentagem de óleo diesel de petróleo aumentava na composição dos combustíveis, maior era a mortalidade dos animais. Dessa forma, o biodiesel puro apresentou menor toxicidade aguda nos organismos.

Porém, outros estudos demonstram que o biodiesel também pode afetar negativamente os organismos. Durante quatro semanas Poon et al. (2007)

administraram óleo diesel, biodiesel derivado de óleos vegetais e biodiesel derivado de gordura animal por via oral a ratos. Apesar dos efeitos, no geral, terem sido mais prejudiciais aos animais tratados com óleo diesel, aqueles tratados com biodiesel também apresentaram aumento no peso do fígado e mudanças histopatológicas nos túbulos renais. Também houve aumento na atividade das enzimas de fase I e II de biotransformação de compostos tóxicos (Figura 23.2), como algumas isoformas de citocromo P450 e atividade da enzima glutatona-S-transferase (GST), respectivamente, após tratamento com biodiesel.

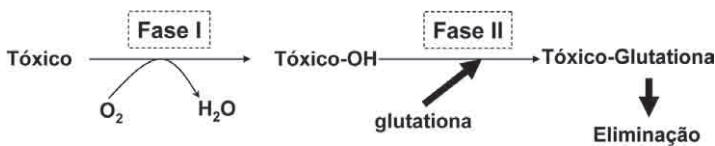


Figura 23.2 – Esquema geral da biotransformação de compostos tóxicos nos organismos vivos que podem ser afetados pela exposição ao biodiesel. Na fase I, enzimas do complexo multienzimático P450 e outras mono-oxigenases inserem grupos funcionais no composto tóxico, tornando-o mais eletrofílico. Na fase II, enzimas de conjugação unem o composto eletrofílico a moléculas endógenas, como glicose, ácido glucurônico, sulfato ou o tripeptídeo glutatona, tornando o elemento mais hidrossolúvel e facilitando sua excreção

Em outros estudos foi verificada a presença de concentrações crescentes de metanol (Leite et al., 2011) no biodiesel de fonte animal ou vegetal, ao longo do tempo de estocagem. Na verdade, grande parte do biodiesel produzido hoje é proveniente de reações de transesterificação entre mono, di ou triacilgliceróis em meio alcalino contendo metanol como fonte de grupo metila para formar o éster metílico do ácido graxo (Vasudevan; Briggs, 2008), como mostra a Figura 23.1. Além do metanol residual que pode, porventura, ocorrer no biodiesel comercial, ao longo do período de sua estocagem reações reversas de hidrólise da transesterificação podem ocorrer, liberando o grupo metila na forma de metanol, que aumenta de concentração ao longo do tempo (Leite et al., 2011). No caso de vazamentos ou derramamentos de biodiesel no ambiente, isso resultaria em uma exposição da biota a este composto, cuja toxicidade já é bem conhecida.

Em trabalhos de nosso grupo de pesquisa, peixes das espécies *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) e *Pterygoplichthys anisitsi* (cascudo marrom)

foram expostos ao óleo diesel puro, às misturas B5, B20 e ao biodiesel puro B100 produzido a partir de sebo animal (Nogueira, 2011). O diesel puro de petróleo e a mistura B5 foram prejudiciais para ambas as espécies de peixes, porém o biodiesel puro e as demais misturas também afetaram negativamente a fisiologia dos animais.

Nas duas espécies houve um aumento nos níveis de lesões em membranas nas brânquias dos animais expostos ao biodiesel puro, assim como efeitos na atividade de enzimas antioxidantes dos animais. Como o biodiesel utilizado nesse estudo foi produzido a partir de gordura animal, pode-se supor que o B100 pode ser absorvido com alto rendimento pelas brânquias, aumentando a quantidade de ácidos graxos no tecido branquial, contribuindo para um aumento nos níveis de peroxidação lipídica.

É possível ainda que elementos potencialmente tóxicos presentes no biodiesel, aldeídos reativos e aditivos tóxicos diversos, mesmo que em baixa concentração, contribuam para os efeitos deletérios observados nos peixes. Tais efeitos poderiam ser potencializados ainda de acordo com o tempo de estocagem do biodiesel, o que contribui para a produção de novos compostos devido a processos de auto-oxidação ou biodegradação do biodiesel.

Nesse contexto, dados recentes indicam que alguns dos elementos possivelmente deletérios do biodiesel perdem seu potencial tóxico em misturas com o diesel de petróleo. De acordo com McCormick (2009), o diesel diminui a taxa de oxidação do biodiesel, fazendo com que haja menos produtos oxidativos. Em seus experimentos, os níveis de compostos ácidos e peróxidos gerados devido à auto-oxidação do B100 aumentaram significativamente ao longo de 12 semanas, enquanto o teste não mostrou nenhuma indicação de que a oxidação de biodiesel esteja ocorrendo em misturas B5, nas mesmas condições de ensaio.

Outro ponto importante a ressaltar é que o biodiesel possivelmente aumente a lipofilia de elementos tóxicos presentes no diesel do petróleo. Assim, em misturas como o B5 e o B20, o biodiesel poderia promover um aumento na absorção dos compostos tóxicos presentes no óleo diesel. Apesar de essa teoria ainda necessitar mais estudos para comprovação, poderia explicar o fato de essas misturas que possuem menor concentração de óleo diesel em sua composição promoverem danos semelhantes ou até mais expressivos que o óleo diesel puro, como visto nos estudos com peixes (Nogueira, 2011).

## Conclusões e perspectivas

Quando olhamos para todos esses estudos, levando em consideração todos os aspectos experimentais, espécies utilizadas e tempo de exposição aos poluentes, podemos perceber que, embora seja um combustível mais biodegradável, que emite menos gases de efeito estufa, tem-se demonstrado que o biodiesel e suas misturas com o óleo diesel também apresentam riscos para o ambiente e, conseqüentemente, também podem vir a apresentar riscos para a saúde humana. Assim, estas novas fontes de energia devem ser manuseadas com cuidado para evitar derramamento e descargas indevidas para o ambiente.

Como bem observaram Swanson, Madden e Ghio (2007) em seu artigo *Biodiesel Exhaust*, a compreensão total sobre os potenciais riscos que o biodiesel pode conferir ao meio ambiente ainda está longe de ser alcançada, não apenas do ponto de vista das emissões geradas em sua queima, mas também do relacionado à exposição direta dos organismos vivos ao óleo do biodiesel em ambientes contaminados. Essa necessidade premente deve-se especialmente ao fato de que o uso deste combustível apenas recentemente está sendo difundido, porém em grande escala (B5 já é obrigatório em nosso país), e de que existem inúmeros tipos de composição para ele, seja devido à suas diferentes fontes (animal ou vegetal, por exemplo), seja pelo processo de produção, tipos de aditivos usados e tempo de estocagem, entre outros. Tais estudos possibilitarão um manuseio mais correto e sustentável desse combustível, contribuindo assim para elevar o *status* do biodiesel como um combustível de fato menos poluente.

## Referências bibliográficas

- ACKLAND, M. L. et al. Diesel exhaust particulate matter induces multinucleate cells and zinc transporter-dependent apoptosis in human airway cells. *Immunology and Cell Biology*, v.85, n.8, p.617-22, 2007.
- BALAT, M.; BALAT, H. Progress in biodiesel processing. *Applied Energy*, v.87, n.6, p.1815-35, 2010.
- CORRÊA, S. M.; ARBILLA, G. Aromatic hydrocarbons emissions in diesel and biodiesel exhaust. *Atmospheric Environment*, v.40, p.6821-26, 2006.
- HAMOUTEN, D. et al. Use of the Comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, v.54, n.3-5, p.471-4, 2002.

- KHAN, N.; WARITH, M. A.; LUK, G. A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends and diesel on aquatic organisms. *Journal of the Air and Waste Management Association*, v.57, n.3, p.286–96, 2007.
- LEE, S. W.; HERAGE, T.; YOUNG, B. Emission reduction potential from the combustion of soy methyl ester fuel blended with petroleum distillate fuel. *Fuel*, v.83, p.1607–13, 2004.
- LEITE, M. B. et al. Toxicity of water-soluble fractions of biodiesel fuels derived from castor oil, palm oil, and waste cooking oil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.30, n.4, p.893–7, 2011.
- LIU, X. Y.; ZHU, M. X.; XIE, J. P. Mutagenicity of acrolein and acrolein-induced DNA adducts. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v.20, n.1, p.36–44, 2010.
- LOTERO, E. et al. The catalysis of biodiesel synthesis. *Catalysis*, v.19, p.41–83, 2006.
- MCCORMICK, R. *Biodiesel Handling and Use Guide*. [s. l.], 2009.
- MOTA, C. J. A.; DA SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção do biodiesel. *Química Nova*, v.32, n.3, p.639–48, 2009.
- NOGUEIRA, L. Estudo comparativo do estresse oxidativo entre tilápias (*Oreochromis niloticus*) e cascudos (*Pterygoplichthys anisitsi*) expostos a óleo diesel e a biodiesel. São José do Rio Preto, 2011. 81f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- NOGUEIRA, L. et al. Biochemical biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after short-term exposure to diesel oil, pure biodiesel and biodiesel blends. *Chemosphere*, v.85, n.1, p.97–105, 2011.
- PASQUALINO, J.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass and bioenergy*, v.30, n.10, p.874–9, 2006.
- POON, R. et al. Effects of three biodiesels and a low sulfur diesel in male rats – A pilot 4-week oral study. *Food and Chemical Toxicology*, v.45, p.1830–7, 2007.
- POON, R. et al. Effects of 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and other candidate biodiesel biocides on rat alveolar macrophages and NR8383 cells. *Archives of Toxicology*, no prelo.
- PRINCE, R. C.; HAITMANEK, C.; LEE, C. C. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. *Chemosphere*, v.71, p.1446–51, 2008.
- SILVA, C. A. et al. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.72, p.400–9, 2009.
- SWANSON, K.; MADDEN, M.; GHIO, A. Biodiesel Exhaust: The Need for Health Effects Research. *Environmental health perspectives*, v.115, n.4, p.496–9, abr. 2007.
- VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production-current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.35, n.5, p.421–30, 2008.
- VIEIRA, P. A. et al. Biodegradation of effluent contaminated with diesel fuel and gasoline. *Journal of Hazardous Material*, v.140, n.1–2, p.52–9, 2007.
- ZHU, S. et al. Simultaneous determination of benzo[a]pyrene and eight of its metabolites in *Fundulus heteroclitus* bile using ultra-performance liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v.863, p.141–9, 2008.

## 24

# Impactos do uso de concentrado de vinhaça biodigerida e outras fontes de nutrientes nos agroecossistemas de cultivo da cana-de-açúcar

*Jairo Osvaldo Cazetta,  
Luciana Maria Saran, Terezinha Ferreira Xavier,  
Kamilla Ortega, Marcos Paulo Mendes*

### Introdução

Em consequência da expansão da indústria sucroenergética no país, vem ocorrendo um aumento significativo da produção de álcool e, conseqüentemente, também da geração de vinhaça e outros subprodutos agroindustriais. No que se refere à vinhaça comum, agora que a utilização deste subproduto como fertilizante foi bem estabelecida no sistema de cultivo e colheita tradicionais da cana-de-açúcar, surgiram alterações importantes no manejo dessa cultura.

A principal mudança é a passagem da colheita da cana queimada para o sistema de colheita da cana crua (sem a queima da palha), acompanhada de alternativas de crescente interesse e importância como, por exemplo, é o caso do cultivo orgânico (Camargo et al., 2006). Nesses novos sistemas, vários aspectos da cultura devem ser repensados, pois a palha (também chamada de palhada) que permanece sobre o solo deve alterar a distribuição do sistema radicular das plantas, a dinâmica química, física, biológica e fitossanitária do agroecossistema, no qual a aplicação da vinhaça pode ter uma forma de participação importante e diferente da que tem no sistema com queima.

Se isso não bastasse, com a perspectiva da produção de álcool de segunda geração (Marques, 2009), em breve teremos também o resíduo desses



novos processos, que será um material de comportamento desconhecido no ambiente do solo. Também a crescente demanda por fontes de energia renovável tem sugerido o uso da vinhaça para produção de biogás, por meio da biodigestão anaeróbica, o qual seria usado em geradores de energia elétrica.

A vinhaça biodigerida é um produto com muito menos matéria orgânica, o que facilita a sua concentração, o reuso da sua água na indústria e a redução do custo de transporte. A soma das vantagens viabilizaria a aplicação agrícola em cultivos mais distantes das usinas. Portanto, se as alterações que o manejo da cultura vem passando já levantam por si sós muitas perguntas ainda sem respostas seguras, o uso do concentrado de vinhaça biodigerida em vez de vinhaça *in natura*, nesse sistema, é uma variável adicional que suscita ainda mais questões, como: A aplicação do concentrado de vinhaça biodigerida altera a dinâmica da decomposição da palhada, a reciclagem dos nutrientes, a fertilidade do solo e a nutrição das plantas, comparada com a vinhaça *in natura*? Será que, por um lado, a vantagem do uso da vinhaça para a produção de bioenergia, com a aplicação da vinhaça biodigerida no campo não trará prejuízo para a cultura? Ou, por outro lado, será que, em vez de a vinhaça ser usada para produzir metano dentro de um reator visando seu uso como combustível para gerar energia, sua aplicação no campo não levaria à rápida decomposição de sua matéria orgânica (portanto, sem vantagens para o sistema agrícola) com a rápida liberação de CO<sub>2</sub>? Pior ainda – será que no sistema de isolamento do solo pela espessa camada de palha que se acumula em certas circunstâncias poderia ser aumentada a condição de anoxia no solo, com a possibilidade de produzir, entre outros compostos, o metano (sem a possibilidade de seu uso) e outros gases que, liberados na atmosfera, são danosos pelo potente efeito estufa e grande contribuição para o aquecimento global? Ou, ainda, será que nesse novo sistema de produção, a adubação está adequada?

Portanto, o domínio dos fenômenos do sistema solo-planta-atmosfera envolvendo o agroecossistema da cana-de-açúcar é de capital importância para o Brasil manter sua liderança no que tange ao *know how* dessa cultura e produtos relacionados. Aliada ao desenvolvimento da tecnologia industrial e novos genótipos, a produção de biomassa do chamado sistema de “cana crua”, cana verde, cana orgânica, entre mais alternativas, lança novos desafios para a agregação de valores aos produtos nacionais. Também induzem mudanças no que se refere à quantidade, qualidade e possibilidades de adu-

bação, alterações na ciclagem de nutrientes e no comportamento deste agroecossistema, certamente com reflexos no ambiente global do ser humano.

Em função do anteriormente exposto, embora muitos aspectos técnicos de alternativas industriais tenham sido propostos e suas viabilidades econômicas possam ser determinadas de forma relativamente simples por meio de cálculos técnicos e econômicos, muitos aspectos agrícolas ainda permanecem sem resposta. Além disso, todas essas perguntas terão de ser refeitas e respondidas em relação aos resíduos que serão produzidos dentro da perspectiva de produção de álcool de segunda geração.

## Aspectos gerais

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) vem sendo cultivada no Brasil há muito tempo, com destacada importância na produção de açúcar. Entretanto, com o advento do Próalcoól nos anos 1980, começou a haver grande expansão da indústria alcooleira no país (Rezende, 1984). Na virada do século esse tipo de agroindústria passou a ser visto como uma das melhores opções de fonte de energia renovável, apresentando grande importância no cenário agrícola brasileiro (Maul; Mazza; Martha Júnior, 2001). Atualmente o Brasil se destaca no cenário mundial como produtor de cana-de-açúcar, cultivando uma área de aproximadamente sete milhões de hectares (Agrarianual, 2011). Naturalmente, acompanhando o aumento significativo da produção de álcool, também cresceu a geração de vinhaça, que é o principal resíduo dessa atividade (Rezende, 1984), pois vinha sendo produzida numa proporção de 13 litros para cada litro de álcool obtido (Rossetto, 2004; Brito; Rolim, 2005), valor este que pode ser reduzido em torno de 8 a 9 litros com a utilização de processos mais modernos.

Considerando que o Brasil produz atualmente cerca de 27 bilhões de litros de etanol e levando em conta uma média de 10 litros de vinhaça produzida por litro de etanol, pode-se avaliar que são produzidos aproximadamente 270 bilhões de litros de vinhaça por ano. A vinhaça *in natura* que era problema no passado é atualmente considerada um insumo de grande valor para a área agrícola. Por isso, qualquer outro destino que se possa pensar para esse produto levanta dúvidas sobre as reais vantagens e desvantagens que outra aplicação traria.

Outro aspecto muito interessante da cultura da cana-de-açúcar é o fato de o etanol e o açúcar serem constituídos apenas de carbono, hidrogênio e oxigênio. Assim, se a vinhaça, as tortas de filtro e as cinzas do bagaço queimado na cogeração de energia forem retornadas às respectivas áreas de cultivo, praticamente todos os minerais retirados da área agrícola pela colheita seriam retornados ao solo. No que se refere ao etanol e açúcar, especialmente se usados para produzir energia ou na alimentação, serão transformados basicamente em gás carbônico e água, que retornariam à lavoura por meio da atmosfera. Caso o etanol ou o açúcar forem usados para a produção de material inerte (como plásticos, por exemplo), o carbono sequestrado será mantido fora do sistema dinâmico por maior tempo, ajudando a diminuir o teor de CO<sub>2</sub> atmosférico e seus efeitos como gás de efeito estufa.

Esse aspecto é um dos grandes diferenciais entre a cultura da cana-de-açúcar e as de cereais ou pastagens, em que os minerais extraídos do solo são definitivamente exportados do mesmo (na forma de grãos, carne, fibra etc.), fazendo com que nutrientes como K, P, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn e Mo tenham sempre que ser repostos nas áreas de cultivo por meio de fertilizantes produzidos a partir de fontes não renováveis. Desse ponto de vista, a cultura da cana-de-açúcar seria um dos sistemas mais sustentáveis que existe no meio agrícola. Entretanto, para que isso aconteça, a coleta e uso racional de todos os resíduos produzidos desde a colheita até o final do processo industrial teriam que ser retornados ao campo original, o que é tecnicamente viável. A viabilidade econômica, no entanto, apenas será alcançada se for usada inteligência, desenvolvimento científico e tecnológico e uma perfeita integração entre o sistema industrial e o agrícola.

## **Características da vinhaça *in natura***

Dentre os principais componentes da vinhaça destaca-se uma concentração significativa de matéria orgânica e de potássio, além de outros nutrientes em concentrações relativamente baixas (Lyra; Rolim; Silva, 2003). As características físicas e químicas das vinhaças são variáveis, dependendo dos processos utilizados na indústria (Gloria; Orlando Filho, 1984). Entretanto, num levantamento realizado em 28 usinas do estado de São Paulo foram observados os seguintes resultados médios: pH=4,15; temperatura =

89,16°C; demanda bioquímica de oxigênio de 16949,76 mg L<sup>-1</sup>; demanda química de oxigênio de 28450,0 mg L<sup>-1</sup>; sólidos totais = 25154,62 mg L<sup>-1</sup>; cálcio = 515,25 mg L<sup>-1</sup>CaO; cloreto = 1218,91 mg L<sup>-1</sup>Cl; cobre = 1,20 mg L<sup>-1</sup>CuO; ferro = 25,17 mg L<sup>-1</sup>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; fósforo total = 60,41 mg L<sup>-1</sup>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; magnésio = 225,64 mg L<sup>-1</sup>MgO; manganês = 4,82 mg L<sup>-1</sup>MnO; nitrogênio = 356,63 mg L<sup>-1</sup>N; nitrogênio amoniacal = 10,94 mg L<sup>-1</sup>N; potássio total = 2034,89 mg L<sup>-1</sup>K<sub>2</sub>O; sódio = 51,55 mg L<sup>-1</sup>Na; sulfato = 1537,66 mg L<sup>-1</sup>SO<sub>4</sub>; sulfito = 35,90 mg L<sup>-1</sup>SO<sub>4</sub>; zinco = 1,7 mg L<sup>-1</sup>ZnO (Rossetto, 2008).

## O uso da vinhaça *in natura* como fertilizante

Nos primórdios da produção de álcool de cana-de-açúcar no Brasil, a vinhaça era um resíduo descartado em rios ou acumulado em lagoas de decantação, o que gerava sérios problemas ambientais. Por volta de 1950 a vinhaça começou a ser usada na lavoura de cana-de-açúcar e, a partir de então, seus efeitos no solo e na cultura passaram a ser mais bem estudados, com um uso mais racional a partir de 1972 (Glória, 1976, 1997). Com a percepção de seus efeitos benéficos como fertilizante do solo, passou a ser uma matéria de valor cada vez maior.

Ao ser aplicada no campo, a vinhaça *in natura* provoca uma série de modificações nas características físicas e químicas do solo, principalmente no pH, CTC, Carbono orgânico, retenção de água, condutividade elétrica, porosidade, afetando também a população e a atividade de microorganismos do solo (Glória, 1976, 1997; Copersucar, 1978; Leal, 1983; Camargo et al., 1984; Sengik, 1988; Mendoza et al., 2000).

De forma geral, parece que a influência da aplicação da vinhaça na agregação do solo é um processo dinâmico e existem indícios de que seus efeitos benéficos estão relacionados com a atividade microbiana (Campos, 1995), principalmente devido à mucilagem excretada pelos microrganismos que metabolizam os açúcares de pequenas cadeias carbônicas, presentes na vinhaça. Assim, sugere-se que altas taxas de aplicação desse resíduo, juntamente com o tempo adequado de contato com o solo, favorecem a aglutinação das partículas, promovendo aumento na sua estabilidade estrutural (Camargo; Valadares; Geraldi, 1983). Entretanto, diferentes condições edafo-climáticas podem induzir diferentes resultados, pois num experi-

mento utilizando doses de vinhaça de 0 a 600 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> por dois anos seguidos em uma área de cana-de-açúcar com latossolo vermelho distroférico típico e textura muito argilosa não se verificou aumento significativo nos índices de agregação do solo (Passarin et al., 2007).

Distintos solos apresentam diferentes capacidades de retenção de elementos orgânicos e inorgânicos. A retenção e a movimentação de elementos solúveis são determinadas pela textura e porosidade do solo e pela característica de cada superfície coloidal. Tais variáveis interferem na solubilidade e troca de íons por processos de adsorção/dessorção (Usman; Gameh, 2008), provavelmente devido à complexação e às reações redox dos elementos ativos na solução do solo. Por isso, essas propriedades são fortemente influenciadas pela quantidade de matéria orgânica e drenagem do solo (Silva; Griebeler; Borges, 2007).

Um dos componentes inorgânicos da vinhaça que tem grande mobilidade no solo é o potássio, pois foram observados aumentos consideráveis das concentrações desse elemento nas diversas camadas até 100 cm de profundidade, em solo que recebeu vinhaça em doses de até 1000m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> (Brito; Rolim, 2005).

Por sua vez, a matéria orgânica da vinhaça parece não ter uma mobilidade muito pronunciada, pois na água do lençol freático a 3m de profundidade numa área fertirrigada com vinhaça não se observou contaminação significativa do aquífero, revelando a grande capacidade do solo em reter compostos orgânicos oxidáveis (Lyra; Rolim; Silva, 2003).

Dessa forma, a experiência indica que, de modo geral, quando a vinhaça é aplicada no solo ocorre uma melhoria em sua fertilidade, porém as quantidades não devem ultrapassar sua capacidade de retenção de íons, isto é, as doses devem ser estabelecidas de acordo com as características de cada solo, pois já que este resíduo possui quantidades desbalanceadas de elementos minerais e orgânicos, pode ocorrer a lixiviação de vários íons, sobretudo do nitrato e do potássio (Silva; Griebeler; Borges, 2007).

Nesse sentido, em abril de 2005 a Cetesb (2009) publicou a portaria n.01/05, reeditada em dezembro de 2006, pela Norma Técnica P4.231, definindo critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação de vinhaça no solo do estado de São Paulo. Nessa regulamentação foi estabelecida a obrigatoriedade de apresentação de um Plano de Aplicação de Vinhaça, até o dia 2 de abril de cada ano, contendo mapas com a identi-

ficação das áreas de aplicação, canais, tanques, dados sobre o solo, formas e doses para a sua aplicação, além da caracterização química da vinhaça a ser utilizada.

A dose máxima de vinhaça definida pela referida portaria da Cetesb é:  $m^3$  de vinhaça/ha =  $[(0,05 \times CTC - K_s) \times 3744 + 185] / K_{vi}$ , onde: 0,05 = 5% da CTC; CTC = capacidade de troca catiônica ( $cmol_c/dm^3$ );  $K_s$  = concentração de potássio no solo ( $cmol_c/dm^3$ ); 3744 = constante –  $cmol_c/dm^3$  para kg de potássio em um volume de 1 ha por 0,8 metros de profundidade; 185 = massa, em kg, de  $K_2O$  extraído pela cultura por ha, por corte;  $K_{vi}$  = concentração de potássio na vinhaça em kg de  $K_2O/m^3$ .

Como pode ser observado na proposta de cálculo acima exposta, num determinado solo é o potássio que baliza ou limita a dose de vinhaça a ser aplicada.

Também do ponto vista da nutrição das plantas de cana-de-açúcar, o potássio destaca-se por ser exportado em maior quantidade, além de influenciar na qualidade da matéria-prima. Por isso, um princípio normalmente usado para orientar a recomendação de adubação potássica nessa cultura é a avaliação da disponibilidade desse nutriente no solo. Normalmente, são determinados os teores considerados trocáveis dos nutrientes no solo, e as interpretações dessas análises são baseadas em faixas de fertilidade, admitindo-se valores mínimos ou críticos abaixo dos quais o desenvolvimento vegetal seria limitado (Orlando Filho, 1996). No caso do potássio, o nível crítico no solo estaria em torno de  $2,1 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$  (Rajj, 1974).

Devido à dinâmica das reações de troca iônica nos solos, é importante considerar as inter-relações entre  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , pois o excesso de um poderá prejudicar os processos de adsorção do outro, bem como influir nas quantidades absorvidas pelas plantas (Orlando Filho, 1996), o que deve ser levado em conta antes de simplesmente descartar a vinhaça no solo de uma cultura.

Os efeitos da aplicação da vinhaça sobre o pH do solo são decorrentes da oxidação da matéria orgânica (elevando o pH do solo), provocada pela população microbiana, que ataca a matéria orgânica e decompondo-a parcialmente diminui a acidez do solo (Silva et al., 1999). Em havendo condições oxidantes e facilidade de movimentação de solução no perfil do solo, o que ocorre em solos bastante arenosos, a alteração do pH pode facilmente alcançar mais de um metro de profundidade (Brito; Rolim, 2005), mas cer-

tamente esse efeito deve ser muito mais restrito às camadas superficiais dos solos argilosos.

Além do potássio e da matéria orgânica, outro elemento da vinhaça bastante visado é o nitrogênio, especialmente nas áreas de cultivo orgânico, onde não se pode aplicar adubo químico e, assim, qualquer quantidade que se possa adicionar de forma orgânica é avidamente visada pelos agricultores.

Apesar de o nitrogênio contribuir com apenas 1%, em média, na massa seca total da cana-de-açúcar, seu papel é tão importante quanto o do carbono, hidrogênio e oxigênio que constituem juntos mais de 90% da matéria seca. No solo, o nitrogênio disponível para as plantas é suprido pela mineralização da matéria orgânica, fixação biológica e adição de fertilizantes nitrogenados (Carneiro; Trivelin; Victoria, 2009). A quantidade de nitrogênio fixado biologicamente parece ser muito variável, depende do sistema de cultivo e das condições edafoclimáticas e, por isso, sua importância no cultivo da cana-de-açúcar ainda é muito discutível, embora na literatura sejam encontradas descrições da ocorrência de fixação biológica de até  $210 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  de N (Vitti et al., 2010).

No sistema tradicional de manejo, a recomendação de adubação para a cultura de cana-de-açúcar segue o proposto no Boletim técnico 100 do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (Spironello et al., 1997), que leva em conta a produtividade esperada, o teor de fósforo e o de potássio no solo para estimar a doses de N,  $\text{P}_2\text{O}_5$  e  $\text{K}_2\text{O}$  a serem aplicadas por hectare. Entretanto, existem dúvidas se tais estimativas seriam adequadas para o sistema de manejo chamado de cana crua, o que justifica a necessidade do desenvolvimento de novos estudos para calibrar a recomendação nesse novo sistema de manejo, especialmente porque, muito provavelmente, diferentes genótipos e condições edafoclimáticas acumulam quantidades diferentes de palha na superfície do solo e mineralizam com distintas velocidades.

No caso da colheita sem a queima das palhas, estas são deixadas sobre o solo. Como tal material possui uma relação carbono/nitrogênio elevada, promove a imobilização do N, especialmente quando é incorporado ao solo, prejudicando as plantas. Embora a quantidade de N na palhada seja pequena comparada com a necessidade da cultura, existem afirmações de que a palhada contribui com a manutenção ou aumento do nitrogênio do solo, que é disponibilizado para as plantas principalmente na medida em que

ocorre a mineralização, especialmente na segunda metade do ciclo da cultura (Gava et al., 2005).

Existem especulações de produtores de cana orgânica de que a pequena contribuição da vinhaça em N poderia auxiliar no aumento da velocidade de decomposição da palhada, mas não existem evidências científicas claras para comprovar esse fenômeno, merecendo mais estudos nesse aspecto. Ao mesmo tempo, existem evidências de que a adição da vinhaça *in natura* no solo pode promover aumento das perdas de nitrogênio por volatilização e esses resultados parecem estar relacionados à melhoria das condições do ambiente biológico do solo e à abrupta oferta de uma quantidade significativa de compostos orgânicos de fácil decomposição, o que estimula o rápido crescimento microbiano responsável por induzir tais perdas (Silva, 1999; Lara Cabezas, 1991; idem et al., 1994; Sengik; Kiehl, 1995). Assim, no caso da vinhaça biodigerida, que perdeu grande parte de sua matéria orgânica na forma de metano e gás carbônico, tudo leva a crer que o comportamento seja distinto da vinhaça *in natura*, mas só se poderá afirmar com certeza após o desenvolvimento de experimentos que comparam o efeito de ambos os tipos de produtos.

Além da volatilização, outras formas de perda de N também são consideradas, pois foi demonstrado que a recuperação de N-ureia pela cana-planta é bastante baixa (entre 21 e 30%, dependendo da situação). Essa baixa recuperação tem sido atribuída às perdas por lixiviação de nitrato, desnitrificação, volatilização do fertilizante e por perdas naturais de N pela folhagem da cultura durante o processo de maturação (Franco et al., 2008). Dessa maneira tem sido demonstrado que, nos sistemas de cultivo tradicionais, a complementação de nitrogênio na forma de fertilizante aplicado após a adição de vinhaça apresenta melhor retorno econômico (Vitti, 2010). Porém, no que se refere à cana com colheita sem queima, os dados ainda são incipientes.

## Uso de vinhaça concentrada, sem prévia digestão

A partir da comprovação dos efeitos benéficos do uso da vinhaça para a cultura da cana-de-açúcar associado à economia de fertilizantes, entre outros aspectos, a limitação de seu uso agricultura passou a ser o custo de transporte e aplicação no campo, sendo viável apenas em curtas distâncias a



partir do ponto de produção. Por isso, desde 1978 a Usina Santa Eliza veio tentando otimizar concentradores e equipamento de aplicação no campo, mas o gasto de energia e o custo da concentração ainda eram muito limitantes, o que passou a melhorar a partir de 1999, com a implantação do sistema de cogeração de energia (Barbosa, 2006).

O uso da vinhaça concentrada viabiliza sua aplicação em cultivos localizados até distâncias em torno de 90 km, sendo demonstrado que sua aplicação na dose equivalente a  $180 \text{ kg ha}^{-1} \text{ K}_2\text{O}$  precisa de uma complementação de adubo nitrogenado para a plena produção, enquanto doses elevadas de vinhaça (acima do equivalente a  $270 \text{ kg ha}^{-1} \text{ K}_2\text{O}$ ) aparentemente poderiam dispensar a adubação nitrogenada (Barbosa et al., 2006), mas tais doses de potássio estariam muito acima da recomendada para a cultura (Spironello et al., 1997) e, dependendo do tipo de solo, poderiam ultrapassar o máximo permitido pela Cetesb (2006).

## A biodigestão da vinhaça

O incentivo do governo brasileiro em transformar o Brasil numa referência na produção de bioenergia, bem como o dos órgãos de fomento à pesquisa nessa área, certamente aumentará a produção de etanol de cana-de-açúcar. Consequentemente ampliará consideravelmente o volume de vinhaça produzida, o que torna premente o desenvolvimento de alternativas inteligentes e viáveis de disposição e aproveitamento desse efluente. Dentre as formas alternativas de conversão da biomassa em energia secundária, destaca-se a biodigestão anaeróbia da vinhaça, o que permite o seu aproveitamento sob a forma de biogás (mistura gasosa rica em metano). Na verdade, a finalidade inicial da biodigestão anaeróbica era o tratamento da vinhaça como efluente poluidor das águas, pois tinha a vantagem de promover grande redução da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), além de produzir o biofertilizante, ter pequena produção de lodo, baixos custos operacionais e de investimento (Pompermayer; Paula Júnior, 2000).

Na Tabela 24.1 são apresentadas algumas alterações que podem ocorrer com a vinhaça *in natura* ao passar pelo processo de biodigestão e concentração. Naturalmente, estas alterações podem variar dependendo do tipo de vinhaça, do sistema de biodigestão empregado, do tipo de concentra-

dor utilizado, bem como do ajuste do mesmo para uma dada operação. A título de ilustração, na Tabela 24.1 é apresentada uma comparação entre os respectivos teores na vinhaça original (VO) com os da mesma vinhaça após passar pelo processo de biodigestão (VB) e concentração (VBC). O aumento do pH ao longo do processo (Tabela 24.1) deve-se principalmente à adição de base visando propiciar condições adequadas para o desenvolvimento dos microorganismos metanogênicos. Dependendo da composição da vinhaça, às vezes é necessário fazer a adição de nitrogênio ou outro componente que esteja em nível subótimo para o processo da biodigestão, o que também pode justificar certas discrepâncias entre a vinhaça natural e a vinhaça biodigerida (VB) ou o concentrado final (CVB).

A redução da carga orgânica (DQO) ocorre devido à transformação da matéria orgânica em gás carbônico, metano, que são os principais componentes do biogás que sai do sistema. Parte do nitrogênio e enxofre também sai do sistema na forma de substâncias voláteis tais como  $N_2$  e  $H_2S$ , como componentes do biogás. Especialmente no caso de compostos de enxofre, estes são prejudiciais aos equipamentos que utilizam este combustível e, por isso, o biogás rico nesses compostos precisa ser previamente tratado antes de ser utilizado. No que se refere a elementos minerais tais como P, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn, as perdas durante o processo de biodigestão podem ocorrer pela formação de precipitados (lodo) que pode acumular no fundo dos reatores e, durante o processo de concentração, pela incrustação nas superfícies internas dos evaporadores e suas tubulações, provavelmente na forma de carbonatos e bicarbonatos.

Quando se utilizam evaporadores de maior circulação interna, as incrustações são menos intensas, porém, tais concentradores demandam um maior consumo de energia para seu adequado funcionamento, devendo, portanto, a escolha do evaporador ser analisada do ponto de vista da relação custo benefício de todo o sistema agroindustrial. No caso de concentradores em que ocorrem incrustações mais intensas, é necessário realizar frequentes operações de limpeza ou *Clean-in-place* (CIP). Nesse caso, o interessante seria fazer a “*cipagem*”, retornando os resíduos no concentrado de vinhaça para devolver os minerais subtraídos no processo de concentração. Para tal limpeza, o ideal seria usar o ácido nítrico, pois seriam obtidos os respectivos nitratos, e além da vantagem de todos os nitratos serem solúveis, estaria sendo reposto também o nitrogênio perdido no processo de biodigestão e concentração.

Tabela 24.1 – Características de uma vinhaça *in natura* ou original (VO), da mesma vinhaça após o processo de biodigestão anaeróbica (VB) e concentrada cerca de 12 vezes (VBC), e cálculo dos valores em relação a uma diluição equivalente em potássio da vinhaça original (VBC eq. em K). Dados obtidos em teste preliminar num projeto piloto da Biotechnical Processes International (BPI) (2011), realizado na Usina São Francisco, Sertãozinho (SP), 2009

Características	Vinhaça Original (VO)	Vinhaça Biodig. (VB)	Vinhaça Biodig. e Conc. (VBC)	VBC equivalente em K da VO	Unidades
pH a 25°C	4,41	7,66	9,31	–	–
Brix	2,3	1,1	12,0	1,0	° Brix
DQO	24,00	7,84	56,00	4,74	g/L O <sub>2</sub>
Sólidos Totais	21,70	13,90	133,31	11,28	g/L
Sólidos Solúveis Totais	19,33	10,41	110,90	9,38	g /L
Matéria Orgânica Solúvel	11,38	2,37	31,04	2,63	g /L
Sólidos Suspensos Totais	2,37	3,49	22,41	1,89	g/L
Matéria Orgânica Suspensa	1,94	2,37	17,21	1,46	g /L
Nitrogênio total	0,23	0,31	0,92	0,08	g/L N
Nitrogênio Solúvel total	0,15	0,17	0,36	0,03	g/L N
Nitrogênio Amoniacal	0,03	0,15	0,08	0,01	g/L N-H <sub>3</sub>
Fósforo	0,03	0,05	0,15	0,01	g/L P
Potássio	2,2	2,2	26,0	2,2	g/L K
Cálcio	0,57	0,53	0,99	0,08	g/L Ca
Magnésio	0,17	0,13	0,65	0,06	g/L Mg
Enxofre	0,39	0,40	0,42	0,04	g/L S
Cobre	0,8	0,9	1,50	0,13	mg/L Cu
Ferro	46,9	43,8	87,0	7,36	mg/L Fe
Manganês	3,6	3,4	4,0	0,34	mg/L Mn
Zinco	0,4	0,5	2,5	0,21	mg/L Zn

A biodigestão anaeróbica da vinhaça é uma alternativa ainda pouco utilizada; entretanto, sua viabilidade vem sendo provada por vários estudos, pois além de reduzir a demanda bioquímica de oxigênio (D.B.O) da vinhaça em 70 a 90%, a quantidade de gás produzida serve como fonte adicional de combustível renovável (Longo, 1994; Freire; Cortez, 2000). Considerando os teores de N/P/K da vinhaça biodigerida, esta pode ser utilizada para a fertirrigação em vez da vinhaça *in natura*, com a vantagem de mais fácil manuseio devido ao seu pH neutro ou alcalino (Lamo, 1991). Além disso, existem estudos mencionando que a vinhaça biodigerida promo-

veu aumento de aproximadamente 30% no conteúdo de C-orgânico e de N-total, indicando que, mesmo com baixo teor de matéria orgânica total em relação à vinhaça *in natura*, sua aplicação no solo resultou em aumento sensível nos teores desses elementos (Longo, 1994).

Outra vantagem da biodigestão da vinhaça é a viabilidade de expansão da distribuição para áreas distantes, uma vez que a vinhaça biodigerida pode ser bastante concentrada, reduzindo os custos com transporte. Entretanto, a diferença existente entre a vinhaça comum e o concentrado de vinhaça biodigerida (Tabela 24.1) certamente deve induzir diferentes reações físicas, químicas, bioquímicas e biológicas no solo. A diferença na resposta biológica está ilustrada na Figura 24.1, na qual pode ser observado um intenso desenvolvimento de fungos nos dois tipos de solos tratados com vinhaça comum, mas não nos tratados com a biodigerida e concentrada, nas mesmas condições de umidade do solo e demais variáveis ambientais.

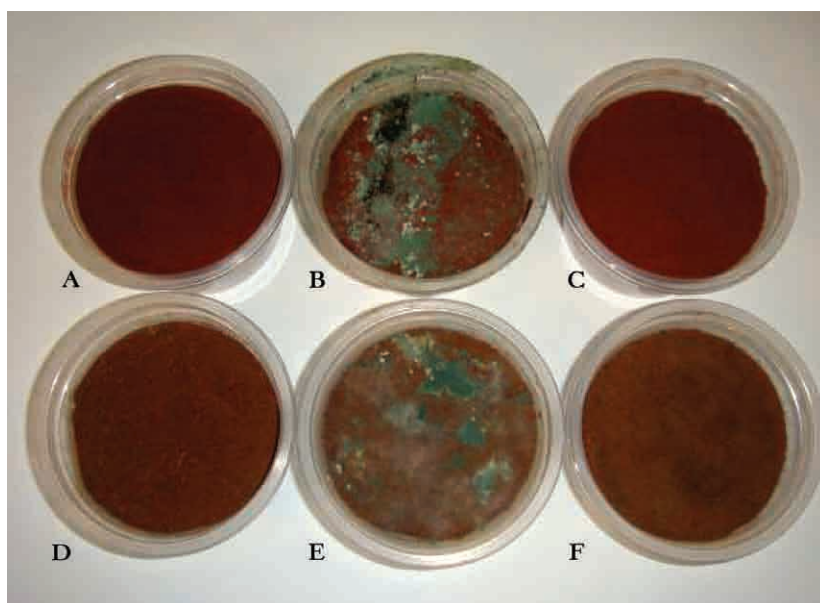


Figura 24.1 – Aspecto geral de fungos crescidos em solo tratado com vinhaça oriunda do processo de produção de etanol de cana-de-açúcar. A = latossolo e D = argissolo, ambos sem tratamento (controle); B = latossolo e E = argissolo, ambos tratados com o equivalente a 100 m<sup>3</sup>/ha de vinhaça *in natura*; C = latossolo e F = argissolo, ambos tratados com concentrado de vinhaça biodigerida, em dose de K equivalente ao de B e E, nas mesmas condições de umidade do solo e demais variáveis ambientais

Embora a análise da Figura 24.1 (especificamente nas imagens C e F) possa sugerir pouca atividade biológica nos solos tratados com concentrado de vinhaça biodigerida, os resultados da determinação da respiração basal dos solos (apresentados no Gráfico 24.1) revelam que a evolução de  $\text{CO}_2$  nos solos tratados com vinhaça biodigerida já é bastante intensa 48 horas após a aplicação, enquanto nos solos tratados com vinhaça *in natura* a atividade biológica mais intensa ocorre logo após esse período (Gráfico 24.1). Levando em conta o observado na Figura 24.1 e no Gráfico 24.1, pode-se concluir que a aplicação dessas diferentes formas de vinhaça devem estimular distintos tipos de microorganismos do solo, o que também precisa ser melhor estudado e determinadas as consequências para a cultura.

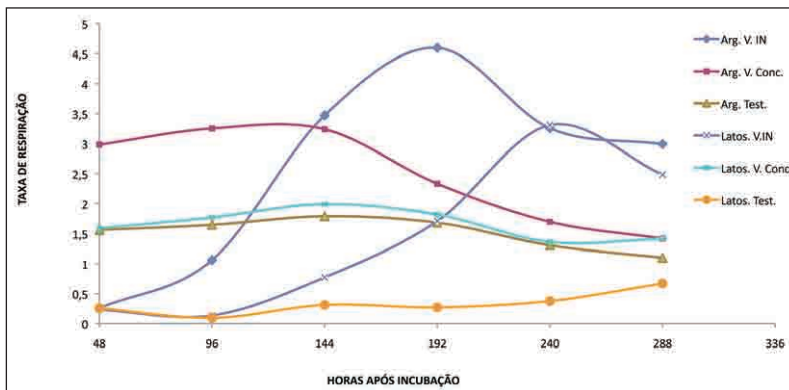


Gráfico 24.1 – Variação da taxa de respiração basal de dois tipos de solo: argissolo (Arg.) e latossolo (Latos.), submetidos a três tratamentos: controle (Test); adicionado de vinhaça *in natura* (V.IN) ou vinhaça biodigerida e concentrada (V. Conc.), nas mesmas condições de umidade do solo e demais variáveis ambientais

Como ilustrado no Gráfico 24.1, as diferentes formas de vinhaça foram aplicadas em condições distintas das que ocorrem no campo e na ausência de palha. Por isso, podem ser levantadas perguntas como: Se tais dados preliminares deixam claro que as diferentes formas de vinhaça alteram o comportamento biológico do solo, será que são suficientes para alterar a fertilidade do solo ou as condições fitossanitárias? O balanço de carbono no solo? Se aplicadas sobre a palhada (no sistema de cana crua) também influenciam de maneira diferente a decomposição dessa camada deixada pela colheita mecânica? Será que podem alterar a ciclagem de nutrientes? Será que aplicada por anos a fio trará alterações significativas para o sis-

tema solo-planta-atmosfera? Ou será que a frenética e distinta atividade biológica não passa de um rápido e efêmero fenômeno, pouco significativo no ecossistema agrícola e no ecossistema global?

Em função do anteriormente exposto, é clara a necessidade de estudos e pesquisas que possam contribuir para o desenvolvimento dessa importante área (multidisciplinar) pois, além da importância econômica e ambiental, ela é também de caráter estratégico para a nação, tanto do ponto de vista econômico quanto do ambiental.

Dentro deste contexto, várias empresas têm procurado desenvolver tecnologias para adequar os sistemas de biodigestão de vinhaça. Inicialmente muitos problemas de entupimento de equipamento e solidificação dos leitos de biodigestão dos reatores limitavam o adequado uso e encareciam a manutenção dos sistemas de biodigestão. Entretanto, empresas como a Dedini, localizada em Piracicaba (SP), têm se associado a produtores de biorreatores como a empresa Holandesa Paques BV para produzir sistemas de biodigestão com sistema de recirculação interna e que apresentam bastante eficiência (Dedini, 2010). Da mesma forma, outras empresas têm procurado transferir o *know-how* utilizado com sucesso no tratamento de outros tipos de efluentes para tratar vinhaça, por exemplo a Biotechnical Processes International (BPI) (2005) que possui diferente tipo de biodigestor e que tem tentando aplicar sua tecnologia no setor de vinhaça oriunda da produção de álcool de cana-de-açúcar.

Uma das características que distingue a vinhaça comum da biodigerida e concentrada é que esta última, por ter menos matéria orgânica, permite uma grande concentração, o que leva a um aumento significativo do teor de eletrólitos na suspensão resultante. Esse elevado teor salino pode provocar queimadura de folhas de plantas jovens, se for aplicada diretamente sobre as mesmas (Figura 24.2).

Uma vez que o processo de biodigestão para produção de biogás exige que o pH da vinhaça original seja elevado para valores ao redor de 8,0, é necessária a adição de uma base antes de ser introduzida no biodigestor, o que eleva ainda mais o teor salino do efluente resultante.

Para a neutralização da acidez da vinhaça, o ideal seria usar hidróxido de potássio (KOH), uma vez que o sal resultante conteria potássio, que é nutriente de plantas. Entretanto, por representar menor custo, o hidróxido de sódio (NaOH) tende a ser preferido, mas introduz na suspensão o sódio

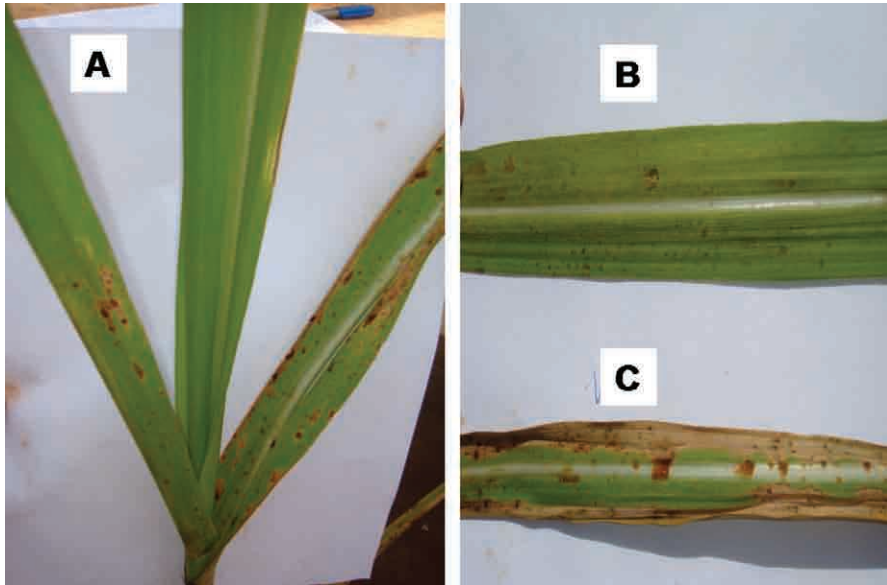


Figura 24.2 – Aspecto geral de uma planta jovem de cana-de-açúcar pulverizada com vinhaça biodigerida e concentrada dez vezes (A); detalhe da folha pulverizada com vinhaça *in natura* ou original (B); aparecimento de manchas cloróticas e pontos necróticos nas folhas que receberam concentrado de vinhaça biodigerida (C)

(Na), que além de não ser nutriente de plantas tem efeito dispersante das partículas estruturais do solo. Isso significa que, se adicionado repetidas vezes ou em doses relativamente elevadas, ele pode contribuir para a compactação do solo e a salinização do mesmo, o que, em conjunto, pode prejudicar o desenvolvimento das plantas (Figura 24.3).

Naturalmente, nas condições de campo em que o sistema é aberto e ocorrem chuvas que auxiliam na diluição dos eletrólitos, bem como na lixiviação dos mesmos, além de extração e exportação pelas colheitas, efeitos tão drásticos seriam difíceis de ocorrer a curto prazo, a não ser que fossem aplicadas doses muito elevadas (e atualmente proibidas pela Cetesb). Entretanto, tais doses foram utilizadas de forma didática neste trabalho com a finalidade de ilustrar os efeitos nas plantas e de mostrar uma possível perspectiva se forem usadas doses indiscriminadamente elevadas ou ocorrer acúmulo no solo.

Finalmente, pelo que se pode depreender das observações da prática, aparentemente a biodigestão da vinhaça para produzir biogás como fonte

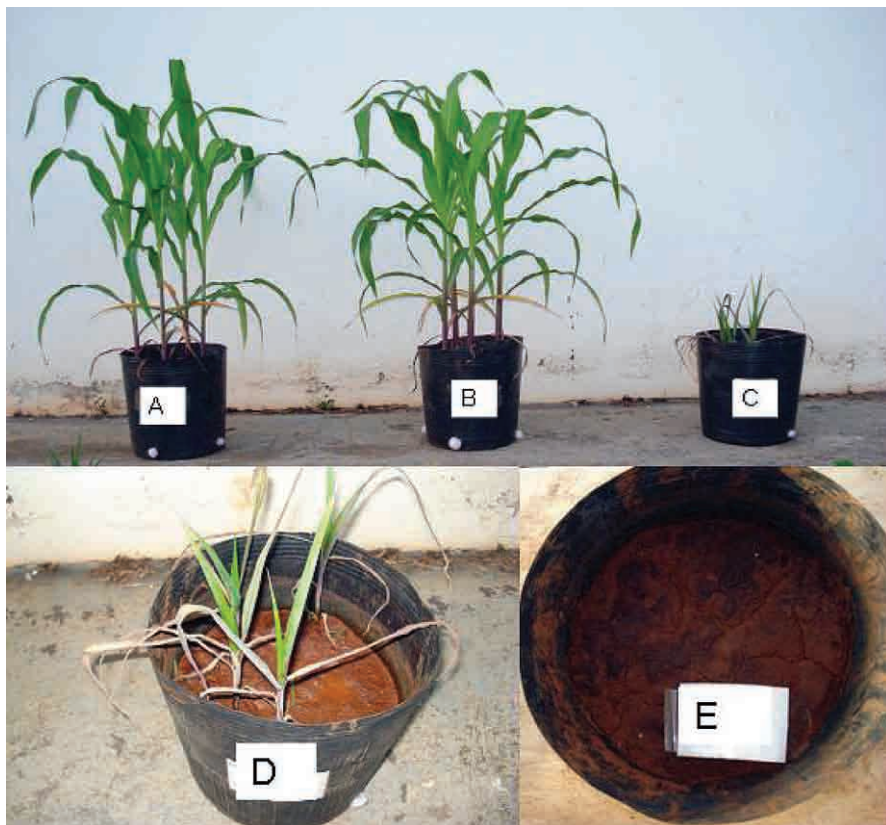


Figura 24.3 – Plantas de milho submetidas a diferentes doses de vinhaça neutralizada com NaOH, biodigerida e concentrada bruta dez vezes: A = controle sem aplicação de vinhaça; B =  $20 \text{ m}^3/\text{ha}$  (equivalente a  $200 \text{ m}^3/\text{ha}$  de vinhaça bruta); C =  $40 \text{ m}^3/\text{ha}$  (equivalente a  $400 \text{ m}^3/\text{ha}$  de vinhaça bruta); D = aspecto do solo compactado que impede o desenvolvimento normal das plantas, na dose de  $400 \text{ m}^3/\text{ha}$ ; E = aspecto do solo extremamente compactado e endurecido com a aplicação de  $80 \text{ m}^3/\text{ha}$  (equivalente a  $800 \text{ m}^3/\text{ha}$  de vinhaça bruta), o que impede completamente a germinação e o desenvolvimento das plantas

de energia, isoladamente, ainda não deve ser economicamente interessante, pois atualmente poucas usinas realizam biodigestão e concentração da vinhaça. Entretanto, a viabilidade econômica desse processo pode ser alcançada se ele for integrado no processo agroindustrial de produção de etanol e cogeração de energia, bem como associado à produção de fertilizantes, para retornar às áreas de cultivo da cana os nutrientes minerais dela retirados e exportados por ocasião da colheita (Olivério et al., 2010).



## Aspectos ambientais

O desenvolvimento de tecnologias mais eficientes no setor industrial, sem sombra de dúvida, é de capital importância. Entretanto, a viabilidade econômica e ambiental só terá sido maximizada com o desenvolvimento paralelo de conhecimento científico dos aspectos agrícolas e ambientais. Esse conhecimento tende a fixar a cultura nas regiões de tradicional cultivo, reduzindo a expansão para áreas de biomas que devem ser preservados.

Estudo recente (Nassar et al., 2008) concluiu que, no Brasil, a expansão de áreas cultivadas com cereais e com pastagem tem ocorrido independentemente do aumento do cultivo de cana-de-açúcar. Nesse estudo também é sugerido que o aumento de produtividade animal das regiões tradicionais de pastagens tem sido responsável pelo aumento da produção pecuária do país, reforçando que o aumento das áreas de desmatamento do bioma Amazônico não está diretamente relacionado com a expansão de áreas de cereais e cana-de-açúcar. O mito de que a cultura da cana-de-açúcar era degradante do solo é outro aspecto que vem sendo vencido, pois vem sendo demonstrado que esta cultura promove maior fixação de carbono no solo e menos erosão, com menor introdução de fertilizantes nas áreas cultivadas, em comparação com a de outras culturas como milho e soja (Amaral et al., 2008).

Embora a produção de energia de cana-de-açúcar para a produção de bioenergia tenha aumentado significativamente, também parece não haver competição com a produção de alimentos, nem tem relação com o aumento do preço de alimentos no mercado mundial (Bance; Nowicki; Meijl, 2008).

Do ponto de vista da qualidade de vida, também tem sido, aos poucos, desvinculada da imagem do passado na qual a produção de cana-de-açúcar era baseada na mão-de-obra escrava, levando à ideia de que esta cultura conduzia à degradação da qualidade de vida do ser humano. Aparentemente, o contrário tem sido observado.

Embora ainda existam muitos aspectos a serem melhorados e ocorra ainda muita desigualdade entre as unidades sucroenergéticas do país, alguns indicativos de melhora devem ser considerados. Um deles é o processo de queima, que está sendo substituído pela colheita de cana crua, que é muito menos poluente. Além disso, as novas tecnologias industriais e agrícolas que o setor sucroenergético precisa usar no dia-a-dia para se manter com-

petitivo exigem cada vez mais mão-de-obra qualificada, o que tem levado as empresas a recrutar e treinar pessoal, que passa a ganhar mais e ter melhor qualidade de vida. Paralelamente, o mercado internacional tem valorizado os produtos que são obtidos por empresas que não degradam o meio ambiente e que valorizam o ser humano. Isso tem levado as usinas a, paralelamente ao desenvolvimento tecnológico, se preocupar com a realização de projetos sociais e com a qualidade de vida da população ligada direta ou indiretamente às unidades de produção (Paiva, 2011).

A agricultura, ao lado de outras atividades humanas, tem uma contribuição muito importante no aumento da geração de gases de efeito estufa e, por isso, também deve ser considerada, paralelamente aos estudos de interesse agrônomo (Robertson; Paul; Harwood, 2000). Esse aspecto tem merecido uma crescente atenção dos pesquisadores brasileiros, tanto pelo aspecto meramente científico quanto pela necessidade de domínio do assunto e da metodologia pertinente (Costa et al., 2006) e também pelo aspecto estratégico da nação, pois o mundo ainda pensa na cana-de-açúcar como cultura degradante do meio ambiente. Este último aspecto é extremamente relevante do ponto de vista do comércio internacional e soberania nacional porque, se por um lado os países interessados no álcool brasileiro reconhecem a importância do Brasil como potencial produtor de biocombustíveis, por outro lado temem que as nossas práticas agrícolas promovam mais perdas do que estocagem do carbono no solo. Esse fato é bastante agravado por não termos muitas pesquisas nessa área e a maioria dos dados existentes terem sido, até então, publicadas em língua pouco lida no mundo (português). Entretanto, tem sido verificado grande esforço para mudar esse aspecto (Zuurbier; Vooren, 2008).

Os temores sobre as trocas de carbono entre o solo e a atmosfera têm seus fundamentos, pois a mera incorporação de resíduos orgânicos ao solo promove aumentos na evolução do  $\text{CO}_2$  (Silva; Griebeler; Borges, 2007). Entretanto, apesar do cultivo da cana-de-açúcar sempre ter sido considerado uma prática degradante do meio ambiente, evidências têm surgido de que a fixação de  $\text{CO}_2$  no solo dessa cultura é maior que a de outras práticas agrícolas (Rossetto, 2004).

A emissão de  $\text{CO}_2$  pelos solos, de forma geral, é resultado da ação de vários processos físicos, químicos e biológicos que estão relacionados com a produção e o transporte deste gás no solo. Vários resultados apontam a

temperatura e a umidade como os principais fatores que controlam a produção de CO<sub>2</sub> no solo (Epron et al., 2006; Kang et al., 2003). No entanto, o teor de matéria orgânica e a porosidade têm sido considerados como as principais variáveis que controlam a emissão de CO<sub>2</sub> do solo (Epron et al., 2006; Schwendenmann et al., 2003; Xu; Qi, 2001).

A temperatura e a umidade ou a interação desses fatores parecem estar mais ligadas à variação temporal da produção de CO<sub>2</sub> numa mesma área de solo (Kang et al., 2003; Kang et al., 2000). Além da temperatura e umidade, a respiração basal do solo também é controlada pelo teor de carbono, biomassa microbiana, nutrientes, pH, capacidade de troca catiônica, teor de óxidos de ferro, densidade e porosidade total do solo (Epron et al., 2006; Xu; Qi, 2001; La Scala; Bolonhezi; Pereira, 2006; Fang et al., 1998). Neste contexto, certamente as diferenças entre vinhaça *in natura* e concentrado de vinhaça biodigerida têm comportamentos distintos (Gráfico 24.1) e devem ainda sofrer interferência e interagir com distintos tipos de solo e formas de manejo da cultura.

A cultura da cana-de-açúcar no sudeste brasileiro tem estado muito relacionada com a produção de alimentos, biocombustível e bioenergia e, por isso, também vem sendo considerada como uma importante alternativa, frente aos problemas das mudanças climáticas (Cerri et al., 2007). O potencial de produção de energia renovável vem sendo bastante discutido em contraposição ao emprego de energia de combustíveis fósseis, mas ainda existem poucos trabalhos que procuram a melhor forma de manejo da cultura de cana-de-açúcar visando a maior conservação do carbono no solo.

Nesse aspecto o Brasil tem procurado desenvolver o sistema de cultivo da cana-de-açúcar sem realizar a queima da palha, o chamado cana crua ou cana verde, em lugar do tradicional sistema de queimada prévia à colheita. Além disso, desde a década de 1990 vários agricultores do estado do Paraná vêm tentando se adaptar ao sistema de cultivo de cana orgânica: forma mais extensiva, a Usina São Francisco de Sertãozinho (SP) foi a pioneira no desenvolvimento do sistema de cultivo da cana orgânica (Rossetto, 2004) e atualmente cultiva cerca de 13.000 ha nessa modalidade (O planeta orgânico visita, s. d.). Apesar de esses sistemas mais conservacionistas terem sido iniciados já há alguns anos, o comportamento da respiração do solo nessa nova sistemática tem sido pouco estudado. Os efeitos da aplicação da vinhaça *in natura* nesses novos sistemas são ainda muito pouco conhecidos.

Especificamente no tocante à aplicação do concentrado de vinhaça biodigerida e outros subprodutos e/ou resíduos as informações são muito escassas.

A despeito das vantagens da cultura de cana-de-açúcar, de ela ser aparentemente menos degradante do solo que o cultivo de cereais e pastagens (Amaral et al., 2008), entre outros pontos positivos relacionados neste capítulo, é necessário ressaltar que a monocultura, seja ela qual for, tende a reduzir a biodiversidade (Balsan, 2006). Portanto, este aspecto é de extrema importância e precisa ser levado em conta, tanto pelas empresas sucroenergéticas quanto pelas políticas públicas de todos os níveis, em especial pelo código florestal. Infelizmente, ainda hoje muitos interesses partidários e econômicos ainda parecem se sobrepor à ciência e ao bom senso nas decisões a serem tomadas pelos governos (Girardi; Fanzeres, 2010). Por isso, é preciso ressaltar que se não for dada a devida atenção aos aspectos ambientais, a crítica internacional (especialmente dos países concorrentes do Brasil na produção de biocombustíveis) poderá ser mais limitante que os aspectos técnicos e econômicos da cultura.

## Referências bibliográficas

- AGRIANUAL 2011: *Anuário da agricultura brasileira*. Cana-de-açúcar. São Paulo: FNP/Argos, p.227-30, 2011.
- AMARAL, W. A. N. et al. Environment sustainability of sugarcane ethanol in Brazil. In: ZUURBIER, P.; VOOREN, J.V.D. (Eds.) *Sugarcane ethanol – Contributions to climate change mitigation and the environment*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2008, p.113-38.
- BALSAN, R. Impactos decorrentes da modernização da agricultura brasileira. *Campo-território: revista de geografia agrária*, v.1, n.2, p.123-51, 2006.
- BANCE, M.; NOWICKI, P.; MEIJL, H. V. Why are current food prices so high? In: ZUURBIER, P.; VOOREN, J.V.D. (Eds.) *Sugarcane ethanol – Contributions to climate change mitigation and the environment*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2008, p.227-52.
- BARBOSA, V. Novas tecnologias no uso da vinhaça e aspectos legais. In: MARQUES, M. O. et al. *Tópicos em tecnologia sucroalcooleira*. Jaboticabal: Multipress, 2006, 191p. p.141-150.
- BARBOSA, V. et al. Uso da vinhaça concentrada na adubação de soqueira de cana-de-açúcar. *STAB*, Piracicaba, v.24, n.6, p.6-8, 2006.
- BPI (Biotechnical Processes International). 2005. Disponível em: <http://www.bpi-bio-tech.com/>. Acessado em: 13 de junho de 2011.

- BRITO, F. L. de.; ROLIM, M. M. Comportamento do efluente e do solo fertirrigado com vinhaça. *Agropecuária Técnica*, v.26, n.1. p.60-7, 2005.
- CAMARGO, A. M. M. P. et al. Área cultivada com agricultura orgânica no estado de São Paulo, 2004. *Informações Econômicas*, São Paulo, v.36, n.3, 2006.
- CAMARGO, O. A.; VALADARES, J. M. A. S.; GERALDI, R. N. *Características químicas e físicas de solo que recebeu vinhaça por longo tempo*. Campinas: Instituto Agrônomo, 1983. 30p. Boletim n.76
- CAMARGO, O. A. et al. Alterações de características químicas em um latossolo roxo distrófico incubado com resíduo de indústria de álcool açucareira. *Bragantia*, v.43, p.125-39, 1984.
- CAMPOS, B. C. et al. Estabilidade estrutural de um latossolo vermelho-escuro distrófico após sete anos de rotação de culturas e sistemas de manejo de solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.19, p.121-6, 1995.
- CARNEIRO, A. E. V.; TRIVELIN, P. C. O.; VICTORIA, R. L. Utilização da reserva orgânica e de nitrogênio do tolete de plantio (colmo-semente) no desenvolvimento da cana-planta. *Scientia Agrícola*, v.52, n.2, p.199, (1995) 2009.
- CERRI, C.E.P. et al. Tropical agriculture and global warming: impacts and mitigation options. *Scientia Agrícola*, v.64, p.83-99, 2007.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo). *Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. Norma Técnica P4.231*, 2006. Disponível em: <http://www.ambientenet.eng.br/TEXTOS/VINHA%C3%87A.pdf>. Acesso em: 2009.
- COPERSUCAR. Aproveitamento da vinhaça: viabilidade técnico-econômica. *Boletim Técnico Coopersucar*, p.1-66, 1978.
- COSTA, F. S. et al. Métodos para a avaliação das emissões de gases do efeito estufa no sistema solo-atmosfera. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.2, p.693-700, 2006.
- DEDINI. Bioequipamentos e plantas. 2010. Disponível em: [http://www.dedini.com.br/web/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6%3Adivisao-bioequipamentos-e-plantas&catid=1&Itemid=4&lang=pt](http://www.dedini.com.br/web/index.php?option=com_content&view=article&id=6%3Adivisao-bioequipamentos-e-plantas&catid=1&Itemid=4&lang=pt). Acesso em: 13 de junho de 2011.
- EPRON, D. et al. Spatial variation of soil respiration across a topographic gradient in a tropical rain forest in French Guiana. *Journal of Tropical Ecology*, v.22, p.565-74, 2006.
- FANG, C. et al. Soil CO<sub>2</sub> efflux and its spatial variation in a Florida slash pine plantation. *Plant and Soil*, v.205, p.135-46, 1998.
- FRANCO, H. C. J. et al. Aproveitamento pela cana-de-açúcar da adubação nitrogenada de plantio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, número especial, 2008.
- FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. *Vinhaça de cana-de-açúcar*. Guaíba: Agropecuária, 2000.
- GAVA, G. J. C. et al. Urea and sugarcane straw nitrogen balance in a soil-sugarcane crop system. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, n.7, p.689-95, 2005.
- GIRARDI, G.; FANZERES, A. O código florestal ao arripio da ciência. *Unesp Ciência*, v.2, n.13, p.16-23, 2010.

- GLÓRIA, N. A. *Emprego da vinhaça para fertilização*. Piracicaba: Codistil, 1976.
- . Utilização racional dos resíduos da fabricação de açúcar e álcool. In: WORKSHOP SOBRE A AVALIAÇÃO E MANEJO DOS RECURSOS NATURAIS EM ÁREAS DE EXPLORAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR, 1997, Aracaju. *Anais...* Aracaju: [s.n.], 1997. p.83-111.
- GLORIA, N. A.; ORLANDO FILHO, J. Aplicação da vinhaça – um resumo e discussão do que foi pesquisado. *Álcool e açúcar*, v.4, n.15, p.22-31, 1984.
- KANG, S. et al. Predicting spatial and temporal patterns of soil temperature based on topography, surface cover and air temperature. *Forest Ecology and Management*, v.136, p.173-84, 2000.
- KANG, S. et al. Topographic and climatic controls on soil respiration in six temperature mixed-hardwood forest slopes, Korea. *Global Change Biology*, v.9, p.1427-37, 2003.
- LA SCALA, N., BOLONHEZI, D., PEREIRA, G. T. Short-term soil CO<sub>2</sub> emission after conventional and reduced tillage of an no-till sugar cane area in southern Brazil. *Soil & Tillage Research*, v.91, p.244-8, 2006.
- LAMO, P. *Sistema produtor de gás metano através de tratamento de efluentes industriais* – Piracicaba: Metax/Biopaq – Cosistil, 1991.
- LARA CABEZAS, W. A. R. *Marcação de vinhaça com N<sup>15</sup> e avaliação de perdas gasosas de nitrogênio da vinhaça-N<sup>15</sup> e ureia-N<sup>15</sup> em solos cultivados com cana-de-açúcar (Saccharum spp)*. Piracicaba, 1991. 85p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- LARA CABEZAS, W. A. R. et al. Perdas gasosas de nitrogênio de vinhaça e ureia em solos cultivados com cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.18, p.463-9, 1994.
- LEAL, J. R. et al. Potencial redox e pH: variação em um solo tratado com vinhaça. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.7, p.257-61, 1983.
- LONGO, M. R. *Efeito da vinhaça in natura e biodigerida em propriedades de um solo cultivado com cana-de-açúcar*. Campinas, 1994. 98p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola.
- LYRA, M. R. C. C.; ROLIM, M. M.; SILVA, J. A. A da. Toposequência de solos fertigados com vinhaça: contribuição para a qualidade das águas do lençol freático. *Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental*, v.7, n.3, p.525-31, 2003.
- MARQUES, F. O alvo é o bagaço. *Pesquisa Fapesp*, n.163, p.17-25, 2009.
- MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA JÚNIOR., G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. *Scientia Agrícola*, v.58, n.2, p.295-301, 2001.
- MENDOZA, H. N. S. et al. Propriedades químicas e biológicas de solo de tabuleiro cultivado com cana-de-açúcar com e sem queima da palhada. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.24, p.201-7, 2000.
- NASSAR, A. M. et al. Prospects on sugarcane expansion in Brazil: impacts on direct and indirect land use changes. In: ZUURBIER, P.; VOOREN, J. V. D. (Eds.) Su-

- garcane ethanol* – Contributions to climate change mitigation and the environment. Vageningen: Wageningen Academic Publishers, 2008, p.63-93.
- O PLANETA ORGÂNICO VISITA. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/native1.htm>>. Acessado em: 16 dez. 2011.
- OLIVÉRIO, J. L. et al. Integrated production of organomineral production of bio-fertilizer (Biofom®) using by-products from the sugar and ethanol agro-industry, associated with the co-generation of energy. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, v.27, 2010.
- ORLANDO FILHO, J. O. et al. Relações K, Ca e Mg de solo areia quartzosa e produtividade da cana-de-açúcar. *STAB*, v.14, n.5, p.13-7, 1996.
- PAIVA, L. Vida com qualidade. *Revista Canamix*, n.34, p.72-9, 2011.
- PASSARIN, A. L. et al. Caracterização de agregados em um latossolo vermelho distroférrico típico submetido a diferentes doses de vinhaça. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.31, n.6, p.1255-60, 2007.
- POMPERMAYER, R. S.; PAULA JÚNIOR, D. R. Estimativa do Potencial de produção de biogás através da biodigestão da vinhaça e comparação com outros energéticos. In: IX SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 2000, Porto Seguro. *Anais...*, 2000. v.CD. p.2564-72.
- RAIJ, B. van. Calibração do potássio trocável em solos para feijão, algodão e cana-de-açúcar. *Ciência e Cultura*, v.26, n.6, p.575-6, 1974.
- REZENDE, J. O. Vinhaça: Outra grande ameaça ao ambiente. *Revista Magistra*, edição especial, jun. 1984.
- ROBERTSON, G. P., PAUL, E. O., HARWOOD, R. R. Greenhouse gases in intensive agriculture: contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science*, v.289, p.1922-5, 2000.
- ROSSETTO, R. A cultura da cana, da degradação à conservação. *Visão Agrícola*, n.1, p.80-5, 2004.
- ROSSETTO, R. et al. Manejo conservacionista e reciclagem de nutrientes em cana-de-açúcar tendo em vista a colheita mecânica. *Informações Agrônomicas*, Piracicaba, n.124, 2008.
- SCHWENDENMANN, L. et al. Spatial and temporal variation in soil CO<sub>2</sub> efflux in an old-growth neotropical rain forest, La Selva, Costa Rica. *Biogeochemistry*, v.64, p.111-28, 2003.
- SENGIK, E.; KIEHL, J. C. Efeito de resíduos orgânicos e do fosfato monocálcico na volatilização de amônia em terra tratada com ureia. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.19, p.231-6, 1995.
- SENGIK, E.; RIBEIRO, A. C.; CONDE, A. R. Efeito da vinhaça em algumas propriedades de amostras de solos de Viçosa (MG). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.12, p.11-5, 1988.
- SILVA, M. A. S. da; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.11, n.1, p.108-14, 2007.

- SILVA, V. M. et al. Mineralização e volatilização do nitrogênio da vinhaça-<sup>15</sup>n na presença ou não de ureia e de palha de cana-de-açúcar. *Scientia agrícola*, v.56, n.1, p.117-24, 1999.
- SPIRONELLO, A. et al. In: RAIJ, B. van. et al. *Recomendações de acubação e calagem para o estado de São Paulo*. 2.ed, Campinas: IAC, Boletim Técnico n.100, 1997. 285p., p.237-239.
- USMAN, A. R. A.; GAMEH, M. A. Effect of sugar wastes on K status and nutrient availability of a newly reclaimed loamy sandy soil. *Archives of Agronomy and Soil Science*, v.54, p.665-79, 2008.
- VITTI, A. C. et al. Potássio. In: DINARDO-MIRANDA, L. C.; LANDELL, M. G. A.; VASCONCELOS, A. C. M. *Cana-de-açúcar*. Campinas: IAC, 2010. 882p., p.289-312.
- XU, M., QI, Y. Soil-surface CO<sub>2</sub> efflux and its spatial and temporal variations in a Young ponderosa pine plantation in northern California. *Global Change Biology*, v.7, p.667-77, 2001.
- ZUURBIER, P.; VOOREN, J. V. D. (Eds.) *Sugarcane ethanol – Contributions to climate change mitigation and the environment*. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2008. 255p.





## Avanços brasileiros no desenvolvimento de normas técnicas analíticas para certificação e controle da qualidade de biodiesel

*Daniilo Luiz Flumignan,  
José Eduardo de Oliveira,  
Rafael Rodrigues Hatanaka,  
Rodrigo Sequinel<sup>1</sup>*

### Histórico do plano nacional de produção e uso do biodiesel

Durante quase meio século, o Brasil desenvolveu pesquisas sobre biodiesel, promoveu iniciativas para usos em testes veiculares e foi pioneiro ao registrar a primeira patente sobre o processo de produção de biodiesel, em 1980. No Governo do Presidente Luiz Inácio Lula da Silva, por meio do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), o Governo Federal organizou a cadeia produtiva, definiu as linhas de financiamento, estruturou a base tecnológica e editou o marco regulatório do novo combustível (PNPB, 2011).

Em 2 de julho de 2003 a Presidência da República instituiu por meio de decreto um grupo de trabalho interministerial encarregado de apresentar estudos sobre a viabilidade de utilização de biodiesel como fonte alternativa

---

<sup>1</sup> Os autores agradecem a José Honório Accarini (assessor da Subchefia de Análise e Acompanhamento de Políticas Governamentais da Casa Civil da Presidência da República), Rafael da Silva Menezes (coordenador de Ações de Desenvolvimento Energético do Ministério da Ciência e Tecnologia), Pedro Castro Neto (professor-titular da Universidade Federal de Lavras e presidente do 4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel) e a Ezo-neth Gomes Souza (Instituto Brasileiro de Petróleo, Gás e Biocombustíveis, Gerência de Normalização da Comissão de Estudo de Biodiesel da ABNT), cujas informações foram de fundamental importância para a elaboração deste capítulo.

de energia. Como resultado foi elaborado um relatório que deu embasamento ao presidente da República para estabelecer o PNPB como ação estratégica e prioritária para o Brasil (Casa civil da Presidência da República, jul. 2003). A forma de implantação do PNPB foi estabelecida por meio do Decreto de 23 de dezembro de 2003 (Casa civil da Presidência da República, dez. 2003).

A estrutura gestora do programa ficou definida a partir da instituição da Comissão Executiva Interministerial do Biodiesel (Ceib), possuindo, como unidade executiva, um grupo gestor. Em 31 de março de 2004, foi aprovado pela Ceib o plano de trabalho que norteia as ações do PNPB. No decorrer de 2004 as ações desenvolvidas permitiram cumprir uma etapa fundamental para o PNPB que culminou com seu lançamento oficial pelo presidente da República Luiz Inácio Lula da Silva, em 6 de dezembro de 2004. Na oportunidade houve o lançamento do Marco Regulatório que estabelece as condições legais para a introdução do biodiesel na Matriz Energética Brasileira de combustíveis líquidos (Casa civil da Presidência da República, jul. 2003).

O PNPB é um programa interministerial do Governo Federal que objetiva a implantação de forma sustentável, tanto técnica quanto economicamente, da produção e uso do biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, via geração de emprego e renda (*ibidem*).

Como fruto desses esforços, em 13 de janeiro de 2005 foi publicada a Lei 11.097, marco regulatório que introduziu formalmente os biocombustíveis, em especial o biodiesel, na matriz energética brasileira, cabendo à Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) a regulação do setor. O marco regulatório foi complementado pelo estabelecimento dos percentuais mínimos de mistura de biodiesel ao diesel e a autorização do uso comercial do biodiesel no Brasil, com base na diversidade de oleaginosas disponíveis no país, na garantia do suprimento e da qualidade, na competitividade frente aos demais combustíveis e em uma política de inclusão social. Estas diretrizes permitem a produção de biodiesel a partir de diferentes oleaginosas e rotas tecnológicas, possibilitando a participação do agronegócio e da agricultura familiar (Casa civil da Presidência da República, jan. 2005).

A regulação feita pela ANP, responsável pela regulação e fiscalização do novo produto no mercado, cria a figura do produtor de biodiesel, estabelece

as especificações do combustível e estrutura a cadeia de comercialização. A regulamentação também permite usos específicos do biodiesel, com misturas superiores à estabelecida pelo marco regulatório, desde que autorizadas pela ANP (2004). A Lei prevê a possibilidade de antecipação dos prazos estabelecidos, a ser determinada por resolução do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE). Para ser autorizada uma antecipação dos prazos pelo CNPE faz-se necessário que o segmento de biodiesel e as demais áreas correlacionadas a ele atendam os seguintes critérios: a) a disponibilidade de oferta de matéria-prima e a capacidade industrial para produção de biodiesel; b) a participação da agricultura familiar na oferta de matérias-primas; c) a redução das desigualdades regionais; d) o desempenho dos motores com a utilização do combustível; e) as políticas industriais e de inovação tecnológica (CNPE, 2005).

No aspecto financeiro, o PNPB conta com apoio de fontes de financiamento junto a dois programas: 1) Programa de Apoio Financeiro a Investimentos do Biodiesel implantado pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e 2) Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar (Pronaf). Os financiamentos ofertados pelo BNDES são destinados a todas as fases de produção do biodiesel, entre elas a agrícola, a de produção de óleo bruto, a de armazenamento, a de logística, a de beneficiamento de subprodutos e a de aquisição de máquinas e equipamentos homologados para o uso deste combustível. Por outro lado, o Pronaf financia o custeio para a produção de oleaginosas. Para obter esse financiamento é necessário apresentar o contrato de compra e venda feito entre o agricultor familiar e o produtor de biodiesel (PNPB, 2011).

Outras instituições com disponibilidade de recursos para financiamento dirigido ao segmento do biodiesel são a Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Na Finep, a modalidade de financiamento destina-se à área de desenvolvimento tecnológico, e é ofertada por meio de chamadas públicas para projetos que envolvam instituições de pesquisa e/ou iniciativa privada. Nesse sentido, em 2006, o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), por meio da Finep, deu início à capacitação de diversas instituições de pesquisa (Furb, UFRGS, UFPR, UFMS, UFMT, UFG, Unesp, IPT, INT, Unicamp, UFSCar, Cetec, UFMG, UFRJ, PUC-RIO, Unifacs, UFPE, UFC, UFMA, UFPI, UFRN, UFPA, Ufam e Unir), integradas à Rede

Brasileira Tecnologia de Biodiesel (RBTB) e presentes em todas as regiões geográficas do país, por meio da consecução de encomendas verticais de projetos de pesquisas no valor de R\$ 22 milhões.

As instituições coordenadoras na execução das propostas foram: Furb (Região Sul), Unesp (Região Sudeste), UFG (Região Centro-Oeste), UFPE (Região Nordeste) e UFRN (Região Norte). O objetivo destas encomendas foi a capacitação técnica dos laboratórios da RBTB para realização, de forma complementar, da certificação e do controle de qualidade do biodiesel comercializado no país, especificados na Resolução ANP n° 42, de 24 de novembro de 2004, atendendo aos interesses dos organismos regulamentadores, empresas, importadores, organismos certificados e à sociedade. Esta Resolução foi posteriormente revogada pela Resolução ANP n.7, de 19 de março de 2008 (ANP, 2008), que estabelece no Regulamento Técnico ANP, a especificação do biodiesel, avaliado por diversas características físico-químicas, mediante o emprego de normas técnicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), American Society for Testing and Materials (ASTM), da International Organization for Standardization (ISO) e do Comité Européen de Normalisation (CEN) (Finep, 2011).

Ao mesmo tempo, o MCT, por meio da Finep, financiou o Projeto Confiabilidade em Ensaios Laboratoriais de Biocombustíveis (Celab), com recursos investidos da ordem de R\$ 16 milhões, cujo início foi em dezembro de 2007 com duração de 36 meses e execução realizada em parceria pelo Centro de Referência em Tecnologias Inovadoras (Fundação Certi) e o Instituto Brasileiro de Petróleo, Gás e Biocombustíveis (IBP). O Projeto Celab teve como objetivo capacitar os laboratórios que integram a Rede de Laboratórios de Caracterização e Controle da Qualidade de Biocombustíveis para que realizem ensaios e análises em biocombustíveis de acordo com requisitos aceitos internacionalmente, de modo a buscar sua acreditação junto ao Inmetro, segundo os requisitos técnicos da ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. O público-alvo prioritário do Projeto Celab são 35 laboratórios de diversas instituições de pesquisa, sendo 22 integrantes da Rede de Laboratórios do Programa de Monitoramento de Combustíveis Líquidos da ANP (PMQC-ANP) e 13 das Redes de Caracterização e Controle da Qualidade dos Biocombustíveis geridas pelo MCT (Redebio, Bioeste, Redebionorte, Biosudeste e Redesulbio) (Celab, s. d.).

No CNPq, a modalidade de financiamento tem por objetivo apoiar atividades de pesquisa científica, tecnológica e de inovação, pela seleção de propostas para apoio financeiro a projetos ofertados mediante chamadas públicas, via editais de pesquisa. Podem apresentar propostas os pesquisadores, professores e especialistas que detenham título de doutor quando da submissão da proposta, com vínculo empregatício ou funcional com Instituições de Ensino Superior (IES), de Pesquisa Científica ou Tecnológica, públicas e privadas, todas sem fins lucrativos, constituídas sob as leis brasileiras e que tenham sua sede e administração no país. Desde 2007, o CNPq publicou diversos editais, na área de biodiesel, por meio dos quais foram contemplados projetos de pesquisas, com recursos no valor global estimado em R\$ 58 milhões nas diversas áreas de biocombustíveis, quais sejam, formação e fixação de recursos humanos, cultivo de plantas de ciclo curto de desenvolvimento destinadas à produção de matéria-prima para obtenção de biodiesel, cadeia de produção e uso de biodiesel, produção de biodiesel a partir de microalgas, obtenção de biodiesel via rota etílica, uso de coprodutos associados à cadeia produtiva de biodiesel e caracterização e controle da qualidade de biodiesel (CNPq, 2011).

A formação da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel (RBTB) constituiu-se em uma das ações do módulo de Desenvolvimento Tecnológico, coordenado pelo MCT, no âmbito do PNPB. No decorrer de 2003 e 2004, foram elaborados projetos em parceria com universidades, institutos e centros de pesquisa, distribuídos em 22 estados da Federação. Este trabalho permitiu o mapeamento da competência instalada no país, servindo como base para a estruturação e implantação da Rede. A execução dos projetos e demais atividades no âmbito da Rede contou com R\$ 12 milhões dos fundos setoriais de C&T alocados em 2003 e 2004. Os projetos da RBTB foram elaborados e executados de forma cooperativa e participativa, com acompanhamento e supervisão do MCT, promovendo parcerias, adequando a realidade e as vocações estaduais ao Programa Nacional, controlando, assim, a aplicação de recursos e evitando a repetição de esforços (RBTB, 2011).

A RBTB possui como coordenação central a Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação do Ministério da Ciência e Tecnologia (Setec/MCT) e possui cinco sub-redes temáticas, a saber: a) matéria-prima; b) estabilidade, armazenamento e problemas associados; c) produção;

d) caracterização e controle de qualidade; e e) coprodutos. Cada sub-rede é representada por uma coordenação técnica indicada pelo MCT, composta por pesquisadores de universidades, institutos e centros de pesquisa, os quais constituem o Comitê Técnico Científico da Rede. A RBTB tem como objetivos principais: a) a consolidação de um sistema gerencial de articulação dos diversos atores envolvidos na pesquisa, no desenvolvimento e na produção de biodiesel, permitindo assim a convergência de esforços e otimização de investimentos públicos e b) a identificação e eliminação de gargalos tecnológicos que venham a surgir durante a evolução do PNPB, o que será feito por meio de constante pesquisa e desenvolvimento tecnológico realizados no âmbito de parcerias entre instituições de P&D e o setor produtivo. Os temas em desenvolvimento na RBTB são (ibidem; Menezes; Neto; Ramos, 2010):

- Matéria-prima: sistemas de produção e obtenção de matérias-primas graxas de origem animal e vegetal; zoneamento pedoclimático; variedades vegetais oleaginosas, óleos de gorduras residuais (OGR's), micro-organismos e algas; economia e modelagem de sistemas; colheita, pós-colheita, processamento e transformação;
- Estabilidade, armazenamento e problemas associados: estudos de estabilidade, formas de armazenamento do biodiesel e das misturas biodiesel/diesel; propriedades de fluxo; avaliação e desenvolvimento de aditivos; vida útil; avaliação das condições ideais de condicionamento;
- Caracterização e controle de qualidade: caracterização das matérias-primas, do biodiesel puro e de misturas biodiesel/diesel, assim como o desenvolvimento de métodos para análise e controle de qualidade, materiais de referências, visando a maior praticidade e economicidade;
- Produção: estudo, desenvolvimento e otimização de tecnologias para a produção de biodiesel em escala laboratorial, piloto e comercial. Adequação do processo de produção de biodiesel às produções locais de matéria-prima, de forma a garantir qualidade e economicidade dos processos;
- Coprodutos: estudos quanto ao destino e uso dos coprodutos, resíduos e rejeitos dos processos de obtenção de matéria-prima, extração de óleo e produção de biodiesel, para que sejam garantidas a agregação de valor e a sustentabilidade da cadeia.

Vale ressaltar que todos os temas contemplam a estruturação de laboratórios e formação de recursos humanos relevantes para o atendimento às demandas do mercado de biodiesel – quanto ao suporte técnico à produção, controle de qualidade do biocombustível produzido e mão-de-obra especializada – cuja produção deverá ocorrer em plantas instaladas de forma dispersa no território nacional. Portanto, as ações da RBTB integram diversos atores envolvidos na cadeia produtiva do biodiesel no país (RBTB, 2011).

Unir toda a comunidade científica brasileira e as várias instituições de pesquisa que se dedicam ao estudo da cadeia produtiva do biodiesel é, também, missão da RBTB. Neste sentido, desde 2006, a RBTB realiza anualmente o Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e tem como patrocinadores a Associação Brasileira das Instituições de Pesquisa Tecnológica (Abipti) e o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). A partir de 2010, o Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e o Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel uniram-se e se firmaram como o principal evento científico brasileiro ligado à cadeia produtiva do biodiesel. Nestes eventos são abordados e divulgados trabalhos científicos nas cinco áreas temáticas que sustentam a Rede. Pesquisadores, empresários e gestores do setor, estudantes e técnicos dos setores público e privado, atuantes em entidades e empresas envolvidas com pesquisa, desenvolvimento e inovação, reúnem-se para debater temas relevantes de toda a cadeia produtiva do biodiesel.

Já em sua 4ª Edição, o Congresso da Rede realizado em outubro de 2010, em Belo Horizonte, superou as expectativas dos organizadores, quando foram selecionados 928 artigos científicos, quase o dobro do ano anterior. Cerca de 1.200 participantes estiveram presentes durante os quatro dias de palestras, mesas-redondas e apresentações de pôsteres. Dentre as temáticas da RBTB, a matéria-prima respondeu por 47% dos trabalhos técnicos apresentados, visto que a produção de oleaginosas alternativas à soja, em larga escala e a preço competitivo, continua sendo um grande gargalo tecnológico para o mercado do biodiesel (RBTB, 2011; Paffrath; Dullius, 2010).

Diante dos desafios impostos, visando à consolidação do PNPB e de outros programas de produção de bioenergia, é cada vez maior a necessidade de profissionais capacitados atuando neste setor, que conheçam toda a cadeia produtiva e proporcionem o desenvolvimento sustentável desses programas de geração de energia renovável. Especializações e cursos profissio-



nalizantes voltados ao setor, no entanto, ainda são poucos se comparados à atual demanda do país (Duarte, 2010; Rodrigues, 2011).

De acordo com o Ministério da Educação (MEC), atualmente, há 17 cursos na área de biocombustíveis e de bioenergia (Tabela 25.1) – três são cursos técnicos e profissionalizantes (nível médio), sete são cursos de graduação tecnológica (nível superior) e sete são cursos de especialização, MBA ou mestrado (nível pós-graduação). A maioria dos cursos ofertados está nos estados de São Paulo, Paraná e Bahia. Com a pouca oferta de cursos de nível superior, os profissionais de áreas correlatas acabam buscando formação mais específica em cursos de especialização, MBA, mestrado e até doutorado (Tabela 25.1) (MEC, 2011; Capes, 2011; Sistec, 2011).

O Catálogo Nacional de Cursos Técnicos do MEC, em seu Eixo Tecnológico de Produção Industrial, estabelece que

o Técnico em Biocombustíveis atua no processamento de biocombustíveis sólidos, líquidos e gasosos, supervisionando desde a aquisição e beneficiamento da matéria-prima até sua comercialização e distribuição. Executa o processamento de óleos vegetais, transformando-os em biocombustíveis líquidos. Atua na produção de biocombustíveis sólidos a partir da utilização de produtos oriundos de florestas energéticas. Processa resíduos agropecuários, objetivando sua transformação em biocombustíveis gasosos. Em sua atuação, auxilia o controle de qualidade da produção. Promove e incentiva a organização do associativismo na cadeia de produção de biocombustíveis. (Sistec, 2011)

O Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis visa formar tecnólogos que se enquadrem na área de Produção Industrial do Catálogo Nacional dos Cursos Superiores de Tecnologia que

compreende tecnologias relacionadas aos processos de transformação de matéria-prima, substâncias puras ou compostas, integrantes de linha de produção específicas. As atribuições do profissional abrangem planejamento, instalação, operação, controle e gerenciamento dessas tecnologias no ambiente industrial. Contempla, também, a programação e controle de produção, operação de processo, gestão da qualidade, controle de insumos, métodos e rotinas. A principal característica desse eixo é a associação de competências da produção industrial àquelas relacionadas ao objeto da produção, na perspectiva de qualidade e pro-

Tabela 25.1 – Cursos na área de biocombustíveis e bioenergia

LOCAL	NOME DO CURSO	INSTITUIÇÃO DE ENSINO
<b>NÍVEL TÉCNICO</b>		
Zé Doca (MA)	Técnico em biocombustíveis *	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA)
Porto Seguro (BA)	Técnico em biocombustíveis *	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia (IFBA)
Pelotas (RS)	Técnico em biocombustíveis *	Conjunto Agrotécnico Visconde de Graça da Universidade Federal de Pelotas (CAVG-Ufpel)
<b>NÍVEL SUPERIOR</b>		
Lençóis Paulista (SP)	Tecnológico em bioenergia *	Faculdade Orígenes Lessa (Facol)
Jaguariaíva (PR)	Tecnológico em bioenergia **	Faculdade Jaguariaíva (Fajar)
Palotina (PR)	Tecnológico em biocombustíveis *	Universidade Federal do Paraná (UFPR)
Matão (SP)	Tecnológico em biocombustíveis **	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP)
Araçatuba, Jaboticabal e Piracicaba (SP)	Tecnológico em biocombustíveis **	Faculdade de Tecnologia de São Paulo (Fatec)
<b>NÍVEL PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU</b>		
Botucatu (SP)	Especialização em gestão da cadeia produtiva de biocombustíveis, com ênfase em biodiesel	Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCA - Unesp)
Morrinhos (GO)	Especialização em biodiesel	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano (IF Goiano)
Matão (SP)	Especialização em biodiesel	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP)
Fortaleza (CE)	MBA em engenharia de petróleo, gás e biocombustíveis	Universidade Paulista (Unip)
<b>NÍVEL PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU</b>		
Salvador (BA)	Mestrado profissional em bioenergia ***	Faculdade de Tecnologia e Ciências (Rede FTC)
São Paulo, Campinas e Piracicaba (SP)	Mestrado em agroenergia ***	Escola de Economia de São Paulo da Fundação Getúlio Vargas (EESP – FGV)
Cidades Paranaenses	Mestrado em bioenergia ***	UEL, UEM, UEPG, Unicentro, Unioeste, UFPR, UTFPR, Tecpar, Iapar, Embrapa Soja e PTI

\* Cursos Reconhecidos pelo MEC, \*\* Cursos Autorizados pelo MEC, \*\*\* Cursos Aprovados pela Capes.

atividade, ética e meio ambiente, viabilidade técnico-científica, além do permanente aprimoramento tecnológico. (Antoniosi; Menezes, 2010)

Especificamente, segundo o Catálogo Nacional dos Cursos Superiores de Tecnologia do MEC,

o Tecnólogo em Biocombustíveis atua na cadeia de produção, comercialização e uso de biocombustíveis sólidos, líquidos e gasosos, planejando, dirigindo, monitorando, gerenciando e controlando matérias-primas, produtos, coprodutos, processos e fatores de produção utilizados nessa cadeia produtiva. A promoção da sustentabilidade, em seu conceito amplo, da conservação ambiental e da inclusão social devem ser princípios orientadores da atuação desse profissional de nível superior. (Sistec, 2011)

Com salários atrativos e a crescente demanda do mercado por profissionais especializados, não vai tardar para que os cursos na área se multipliquem pelo país afora nos próximos anos. Essa nova geração de especialistas poderá abrir caminhos para um setor mais competitivo e sustentável.

## Introdução

A matriz energética brasileira agregou nos últimos anos mais um componente de grande peso, os biocombustíveis. Estes constituem uma alternativa viável aos combustíveis derivados do petróleo, podendo participar de maneira significativa no suprimento de energia no futuro. A participação dos biocombustíveis na matriz energética depende de um complexo arranjo de fatores envolvendo os aspectos de produção (matéria-prima e tecnologia) e da sustentabilidade (social, econômica e ambiental) dessa fonte de energia. O biodiesel, combustível sucedâneo do diesel mineral, obtido a partir de óleos/gorduras, traz consigo várias vantagens enquanto pretense substituto do diesel. Suas características físico-químicas são bastante similares, sobretudo no que diz respeito aos parâmetros de injeção e combustibilidade. A grande diversidade edafoclimática brasileira possibilita encontrar uma gama de oleaginosas com grande potencial para produção de biodiesel, dispersas em todo o território nacional (Sebrae, s. d.).

A qualidade do biodiesel está diretamente relacionada com sua sustentabilidade econômica e ambiental. Desde o início do PNPB, a qualidade do biodiesel sempre esteve ligada ao desempenho dos motores, principalmente em decorrência da comparação ambiental e econômica entre veículos movidos com esse combustível e os movidos com combustíveis tradicionais. Em futuro próximo, a qualidade do biodiesel desempenhará um papel decisivo na possibilidade de conversão do biodiesel em *commodity* no mercado internacional (Bonomi, 2010).

A estrutura regulatória existente hoje no Brasil dá sustentação à produção e à comercialização do biodiesel, visto como uma *commodity*, em um mercado globalizado. Três entidades federais fazem parte desta estrutura. São elas:

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), implantada pelo Decreto n.2.455, de 14 de janeiro de 1998. É o órgão regulador das atividades que integram a indústria do petróleo, gás natural e biocombustíveis no Brasil, sendo, dessa forma, responsável pela definição das especificações dos biocombustíveis e pelo controle da sua qualidade, em todas as etapas da cadeia de produção e comercialização (ANP, 2011).

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro), criado pela Lei n.5.966, de 11 de dezembro de 1973 que tem como atribuição no campo metrológico a formulação, coordenação e supervisão da política nacional de metrologia, normatização e qualidade industrial, sendo, dessa forma, responsável pelos padrões metrológicos do país (Inmetro, 2011).

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), fundada em 1940, que é o órgão responsável pela normatização técnica no país, fornecendo a base necessária ao desenvolvimento tecnológico. A ABNT é responsável pela emissão de normas técnicas atualizadas e sintonizadas com a tecnologia e com as especificações e regulamentos vigentes e é constituída por Organismos de Normalização Setorial e Comitês Brasileiros, denominados genericamente de Comitês Técnicos. Fazendo parte do Organismo de Normalização Setorial (ONS-34 – Petróleo), está a Comissão de Estudo de Biodiesel (CE-00.001.62), composta por diversos agentes de instituições públicas e privadas, atuantes em entidades reguladoras ou em empresas envolvidas em pesquisa, desenvolvimento e inovação (ABNT, 2011b).

A caracterização e o controle de qualidade dos biocombustíveis dependem substancialmente de três fatores: das especificações normatizadas

(atribuição do órgão regulador: ANP), das normas técnicas oficiais de análise (atribuição do órgão de normatização técnica: ABNT) e dos materiais de referência certificados (atribuição do órgão metrológico: Inmetro). As especificações são um conjunto de características necessárias para assegurar que o biocombustível cumpra sua finalidade. As normas técnicas oficiais são os instrumentos e procedimentos necessários para avaliação das especificações normatizadas do biocombustível. Os materiais de referência certificados são dispositivos usados na avaliação, validação e controle analítico das normas técnicas oficiais (Bonomi, 2010).

Consoante a uma de suas atribuições, como órgão regulador, a ANP, no dia 19 de março de 2008, publicou a Resolução ANP n.07<sup>2</sup> que tem como objetivo regulamentar o biodiesel de origem nacional ou importada, a ser comercializado em todo o território nacional, bem como especificar suas características e controle de qualidade (ANP, 2008). Considerando que as especificações do biodiesel são normatizadas por organismos nacionais (ABNT) e internacionais (ASTM e CEN), este capítulo tem por objetivo contribuir para uma ilustração do estado da arte das normas técnicas analíticas oficiais brasileiras, aplicadas ao biodiesel.

## **As especificações para caracterização e controle da qualidade do biodiesel**

A qualidade de um produto pode ser definida em termos de sua “adequabilidade para determinada aplicação”. O controle da qualidade é realizado por meio de análises e ensaios apropriados que apresentem boa precisão e reprodutibilidade e de preferência que sejam os mais simples possível. Para garantir a qualidade de um produto, um desempenho satisfatório na aplicação a que se destina e a uniformidade de fabricação são estabelecidas as especificações. A especificação de um biocombustível para motores é definida por meio de um conjunto de características necessárias ao bom desempenho dos motores. Uma especificação eficiente pode ser definida como aquela que dá um controle adequado da qualidade do produto, sem

---

2 Revogada pela Resolução ANP n.14, de 11.5.2012, DOU, 18 maio 2012. Efeitos a partir de 18.5.2012.

ser demasiadamente restrita e que ao mesmo tempo envolva um mínimo de esforço para ser avaliada (Bonomi, 2010).

A ANP, bem como todos os organismos reguladores internacionais, não regulamenta a composição química dos combustíveis, mas estabelece, por meio de resoluções e regulamentos técnicos, especificações que determinam a qualidade mínima requerida ao uso destes produtos. As especificações do biodiesel, cujas propostas são elaboradas por técnicos especializados, conhecidos como especialistas em regulação de petróleo e derivados e gás natural, são estabelecidas a partir de necessidades e discussões, buscando o consenso entre os agentes ligados à cadeia de produção e uso de biodiesel, bem como o atendimento aos órgãos ambientais e aos anseios do consumidor. Estas especificações são periodicamente revisadas de modo a atender às novas tecnologias de motores, às exigências ambientais e, finalmente, às necessidades de abastecimento de produtos para a sociedade.

Como exemplo do contínuo aprimoramento das especificações do biodiesel, em março de 2008, foi realizada a revisão das especificações brasileiras para caracterização e controle de qualidade do biodiesel, Resolução ANP n.07, sendo regulamentada a exclusão de características de qualidade inadequadas (por exemplo, temperatura de destilação equivalente a 90% de volume recuperado), inclusão de novas normas técnicas oficiais (por exemplo, EN ISO 3675, ASTM D6304, NBR 15342), bem como a alteração da proporção em volume de biodiesel que deverá ser adicionado ao óleo diesel. A partir desta Resolução e da Resolução CNPE n.06/2009, convencionou-se adotar a expressão BX na qual B significa Biodiesel e X a proporção do biocombustível misturado ao óleo diesel. Assim, a sigla B2 significa 2% de biodiesel (B100), derivado de fontes renováveis e 98% de óleo diesel e o B5 equivale a 5% de biodiesel e 95% de óleo diesel. Estas misturas estão aprovadas para uso no território brasileiro e devem ser produzidas segundo as especificações técnicas definidas pela ANP. Portanto, a especificação do biodiesel, além de assegurar a sua qualidade, é um padrão de referência para o mercado consumidor (ANP, 2008).

O mercado internacional aponta no sentido de uma demanda crescente, para o biodiesel, estimulada por políticas públicas, visando à modernização da matriz energética mundial, por meio do uso de energias renováveis e ambientalmente amigáveis. Atualmente, existem diferenças importantes entre as especificações brasileiras e internacionais para os biocombustíveis em ge-

ral e, em especial, para o biodiesel. Visando à comercialização internacional (importação e exportação) do biodiesel, é imprescindível a harmonização das normas técnicas (*White Paper...*, 2007).

Um potencial obstáculo à maior eficiência no mercado global de biocombustíveis são as diferenças – e às vezes conflitos – entre as normas que regem suas composições e propriedades. Para esclarecer a situação atual e identificar potenciais barreiras à maior compatibilização, os governos do Brasil e dos Estados Unidos e a Comissão Europeia criaram uma força-tarefa de especialistas das organizações de normatização para comparar especificações críticas em padrões usados internacionalmente para biodiesel, tais como conteúdo, características físicas e níveis de contaminação que determinam sua qualidade.

O *White Paper on Internationally Compatible Biofuels Standards*, documento fruto do processo de avaliação de harmonização tripartite, identificou que as principais especificações para biodiesel presentes nas regulamentações podem ser classificadas em três categorias: (A) semelhantes (e podem ser consideradas compatíveis); (B) diferentes, mas podem ser harmonizadas no curto prazo; (C) incompatíveis tais como se apresentam. A Tabela 25.2 classifica as diferenças encontradas nas especificações do biodiesel combustível. O relatório lista seis especificações como compatíveis e sugere que muitas das diferenças restantes podem ser solucionadas por meio da mistura de diversos tipos de biodiesel, para criar um produto final que satisfaça as diferentes normas regionais, relativas à qualidade do combustível e a emissões. Os especialistas também concluíram que os conjuntos de normas técnicas desenvolvidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), pela ASTM Internacional e pelo Comitê Europeu de Normalização (CEN) vêm sendo amplamente utilizadas pelos países no comércio de biocombustíveis, e as especificações nelas contidas possuem significativa base comum e, portanto, representam poucos obstáculos ao comércio de biocombustíveis (*White Paper...*, 2007).

A Tabela 25.3 compara as especificações (características, limites e normas técnicas) para caracterização e controle de qualidade de comercialização do biodiesel, adotadas no Brasil pela Resolução ANP n.07 (ANP, 2008). Esta normativa é substituída da Resolução ANP n.42, de 24 nov. 2004, e é equivalente à EN 14214 (CEN, 2008) na Comunidade Europeia, e à ASTM D6751 (ASTM, 2011) nos Estados Unidos. A mistura óleo diesel/biodie-

Tabela 25.2 – Classificação das diversas especificações do biodiesel

CATEGORIA A (semelhantes)	CATEGORIA B (diferentes)	CATEGORIA C (incompatíveis)
Cinzas SULFATADAS	Teor de glicerol total	Teor de enxofre
Teor de metais alcalinos e metais alcalinos terrosos	Teor de fósforo	Ponto de entupimento de filtro a frio
Teor de glicerol livre	Resíduo de carbono	Número de cetano
Corrosividade ao cobre	Teor de éster	Estabilidade à Oxidação
Teor de metanol ou etanol	Temperatura de destilação	Mono, di- e triacilglicerídeos
Índice de acidez	Ponto de fulgor	Densidade
	Contaminação total	Viscosidade cinemática
	Água e sedimentos	Índice de iodo
		Teor de ácido linolênico
		Ésteres metílicos poliinsaturados

sel tem sua especificação estabelecida pela Resolução ANP n.42, de 17 de dezembro de 2009, retificada em 14 de janeiro de 2010 (ANP, 2009). Entre as características instituídas nas normas técnicas, encontram-se as que são provenientes da normatização do diesel mineral e as que foram originadas de análises dos óleos vegetais, comumente utilizados na indústria oleoquímica. Características como viscosidade cinemática, ponto de fulgor e cinzas sulfatadas, embora tenham origem na normatização do diesel mineral, fornecem resultados bastante esclarecedores quanto à qualidade do biodiesel, conforme será abordado a seguir.

Por fim, os especialistas concluíram o documento reconhecendo que muitas das variações em especificações podem ser explicadas pelos diferentes procedimentos e métodos de medição. No sentido de corrigir tais desvios três importantes institutos de metrologia – o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial do Brasil (Inmetro), o Instituto Nacional de Normas e Tecnologia dos EUA (Nist), e o Instituto para Materiais de Referência e Medidas da Comissão Europeia (IRMM) – vêm colaborando no desenvolvimento de procedimentos comuns de medição para o biodiesel, como complemento ao trabalho das organizações de normatização. Os esforços iniciais concentraram-se na criação de materiais de referência certificados para avaliação, validação e controle analítico das normas técnicas oficiais em comum (*White Paper...*, 2007; Stradiotto et al., 2010).



Tabela 25.3 – Especificações de caracterização e controle de qualidade do biodiesel

Características	Método de Ensaio				Unidade	Limites		
	EUA (ASTM D6751)	UE (EN 14214)	Brasil (Resolução ANP 07)			EUA (ASTM D6751)	EU (EN 14214)	Brasil (Res. ANP 07)
<i>Cinzas Sulfatadas</i>	ASTM D874	ISO 3987	NBR 6294 ASTM D874	ISO 3987	% massa	0,020 máx.	0,020 máx.	0,020 máx.
<i>Metais do Grupo I (Na + K)</i>	–	EN 14108 EN 14109 EN 14538	NBR 15553 NBR 15554 NBR 15555 NBR 15556	– EN 14108 EN 14109 EN 14538	ppm	5,0 máx.	5,0 máx.	5,0 máx.
<i>Metais do Grupo II (Ca + Mg)</i>	–	EN 14538	NBR 15553 NBR 15556	– EN 14538	ppm	5,0 máx.	5,0 máx.	5,0 máx.
<i>Teor de Metanol ou Etanol</i>	–	EN 14110	NBR 15343	– EN 14110	% massa	0,20 máx.	0,20 máx.	0,20 máx.
<i>Índice de Acidez</i>	ASTM D664	EN 14104	NBR 14448 ASTM D664	EN 14104	mg KOH/g	0,50 máx.	0,50 máx.	0,50 máx.
<i>Glicerol Livre</i>	ASTM D6584	EN 14105 EN 14106	NBR 15341	ASTM D6584 EN 14105 EN 14106	% massa	0,020 máx.	0,020 máx.	0,020 máx.
<i>Glicerol Total</i>	ASTM D6584	EN 14105	NBR 15344	ASTM D6584 EN 14105	% massa	0,240 máx.	0,250 máx.	0,250 máx.
<i>Corrosividade ao Cobre</i>	ASTM D130	EN 2160	NBR 14359 ASTM D130	EN 2160	classificação	Classe 3	Classe 1	Classe 1
<i>Teor de Fósforo</i>	ASTM D4951	EN 14107	NBR 15553	ASTM D4951 EN 14107	mg/kg	10 máx.	4,0 máx.	10 máx.
<i>Resíduo de Carbono em 100% da amostra</i>	ASTM D4530	EN 10370	– ASTM D4530	– ASTM D4530	% massa	0,050 máx.	–	0,050 máx.

Continua

Tabela 25.3 – Continuação

Características	Método de Ensaio				Limites			
	EUA (ASTM D6751)	UE (EN 14214)	Brasil (Resolução ANP 07)	Unidade	EUA (ASTM D6751)	EU (EN 14214)	Brasil (Res. ANP 07)	
<i>Teor de Éster</i>	–	EN 14103	NBR 15342	EN 14103	–	96,5 mín.	96,5 mín.	
<i>Ponto de Fulgor</i>	ASTM D93	EN 2719 EN 3679	NBR 14598	EN 3679	93 mín.	101 mín.	100 mín.	
<i>Contaminação Total</i>	–	EN 12662	–	EN 12662	–	24 máx.	24 máx.	
<i>Água e Sedimentos</i>	ASTM D2709	–	–	–	0,050 máx.	–	–	
<i>Teor de Água</i>	–	EN 12937	–	EN 12937	–	500 máx.	500 máx.	
<i>Estabilidade à Oxidação, 110 °C</i>	–	EN 15751 EN 14112	–	EN 14112	3,0 mín.	6,0 mín.	6,0 mín.	
<i>Teor de Monoacilglicerol</i>	–	EN 14105	NBR 15342 NBR 15344	EN 14105	–	0,80 máx.	Anotar	
<i>Teor de Diacilglicerol</i>	–	EN 14105	NBR 15342 NBR 15344	EN 14105	–	0,20 máx.	Anotar	
<i>Teor de Triacilglicerol</i>	–	EN 14105	NBR 15432 NBR 15344	EN 14105	–	0,20 máx.	Anotar	
<i>Enxofre Total</i>	ASTM D5453	EN 20846 EN 20884	–	EN 20846 EN 20884	15 (Grau S15) máx. 500 (Grau 500) máx.	10 máx.	50 máx.	

Continua

Tabela 25.3 – Continuação

Características	Método de Ensaio				Unidade	Limites		
	EUA (ASTM D6751)	UE (EN 14214)	Brasil (Resolução ANP 07)			EUA (ASTM D6751)	EU (EN 14214)	Brasil (Res. ANP 07)
<i>Ponto de Entupimento de Filtro a Frio</i>	ASTM D6371	–	NBR 14747	ASTM D6371	°C	–	–	19 máx.
<i>Viscosidade Cinemática</i>	ASTM D445	EN 3104	NBR 10441	ASTM D445	mm <sup>2</sup> /s	1,9 - 6,0	3,5 - 5,0	3,0 - 6,0
<i>Densidade a 15 °C</i>	–	EN 3675 EN 12185	–	–	kg/m <sup>3</sup>	–	860 - 900	–
<i>Densidade a 20 °C</i>	–	–	NBR 7148 NBR 14065	ASTM D1298 ASTM D4052	kg/m <sup>3</sup>	–	–	850 – 900
<i>Limite de Metila</i>	–	EN 14103	–	–	% massa	–	12,0 máx.	–
<i>Éster Metílicos Polinsaturados (≥ 4 duplas ligações)</i>	–	EN 15779	–	–	% massa	–	1 máx.	–
<i>Número de Cetano</i>	ASTM D613	EN 5165	–	ASTM D613 ASTM D6890	–	47,0 mín.	51,0 mín.	Anotar
<i>Índice de Iodo</i>	–	EN 14111	–	–	g iodo/100 g	–	120	Anotar

## Os Materiais de Referência Certificados (MRC) para biodiesel

Para garantir a qualidade, competitividade e o fortalecimento do biodiesel como uma *commodity* no mercado internacional, é necessário que as medições analíticas das características de qualidade deste biocombustível apresentem rastreabilidade e confiabilidade, obtidas por meio da utilização de materiais de referência certificados (MRC), que são rastreados de acordo com referências nacionais e internacionais, e que são utilizados na validação e controle da qualidade de métodos e na calibração de instrumentos analíticos (Stradiotto et al., 2010).

O MRC é um

material de referência, acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedade, certificado por um procedimento que estabelece sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores da propriedade são expressos, com cada valor certificado acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido. (Inmetro, 2011)

Os MRC possuem a mais alta qualidade metrológica e são preparados e utilizados visando a três funções principais:

- a) ajudar no desenvolvimento de métodos e análises mais exatos (métodos de referência),
- b) calibrar sistemas de medições usados para melhorias nas trocas de bens, estabelecimento de controle da qualidade, determinação das características de desempenho ou medição de propriedades e
- c) assegurar a adequação e a integridade dos programas de controle de qualidade em medições de longo prazo.

O Inmetro vem desenvolvendo MRC que podem ser utilizados por vários laboratórios do país que atuam em diferentes áreas. Na área de biocombustível, o Inmetro, por meio da parceria com o National Institute of Standards & Technology (Nist) dos Estados Unidos, desenvolveu dois MRC para análise de biodiesel, um constituído somente de biodiesel de soja (SRM 2772) e outro de um *blend* de biodiesel de gordura animal/soja (SRM 2773), conforme definido no *White Paper on Internationally Compatible Biofuels Standards* e elaborado pelo Grupo de Trabalho Tripartite – Brasil, Estados Unidos e União Europeia (ANP, 2009).

O MRC de biodiesel *blend* de gordura animal/soja foi preparado a partir de uma mistura composta por aproximadamente 85% de gordura animal e 15% de óleo de soja enquanto o MRC de biodiesel de soja foi produzido com óleo de soja puro (Gonçalves et al, 2009). A Tabela 25.4 apresenta os valores certificados com as respectivas incertezas expandidas dos MRC de biodiesel *blend* de gordura animal/soja e de soja. A Tabela 25.4 destaca os valores certificados, determinados com elevados níveis de confiança e exatidão, alcançados por meio do uso de equipamentos calibrados, métodos primários de medição e padrões; os valores de referências, valores que não atendem a todos os critérios do Nist para certificação de materiais de referência e com valores de incerteza que podem não incluir todas as fontes; e os valores de informação, valores com menor confiança metrológica, nem sequer são acompanhados dos valores de incerteza, mas foram colocados no certificado, pois são de interesse dos usuários dos MRCs.

Os materiais de biodiesel à base de soja e de origem animal foram obtidos de produtores comerciais e armazenados, sob atmosfera de argônio, em ampolas de 10ml e seladas com chama. As características físico-químicas certificadas pelo Inmetro e pela Nist são: nove (SRM 2772 – C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C18:2, C18:3 e C20:0) e treze (SRM 2773 – C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 n-9, C18:1 n-7, C18:2, C18:3, C20:0, C20:4 e C22:0) ésteres metílicos de ácidos graxos, água, enxofre (SRM 2773), densidade a 20°C e viscosidade cinemática a 20, 30 e 40°C (ibidem).

As características físico-químicas, três (SRM 2772 – C15:0, C17:0 e C22:0) e cinco (SRM 2773 – C10:0, C18:1, C19:0, C21:0 e C23:0) ésteres metílicos de ácidos graxos, índice de acidez, dioleína e diolinoleína, glicerina livre, metanol, monooleína, monolinoleína e monolinolenina, monopalmitina, poder calorífico, estabilidade à oxidação e trioleína foram estudadas e expressas como valores de referência pelo Inmetro e pela Nist. As demais características foram somente expressas como valores informativos. São elas: constituintes elementares (cobre, ferro, fósforo, sódio, potássio, cálcio e magnésio), glicerina total, etanol, monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos (ibidem).

O desenvolvimento de um MRC envolve estudos de caracterização, homogeneidade, estabilidade de curta duração (simulação das condições de transporte) e estabilidade de longa duração (simulação do período de estocagem) realizados de acordo com as diretrizes propostas na ISO Guide 35. O processo de caracterização provê os valores das propriedades que serão quantificadas, o estudo de homogeneidade indica se todo o lote avaliado possui propriedades

Tabela 25.4 – Características e valores certificados e valores de referência e valores de informação para os MRCs de biodiesel blend de gordura animal/soja (SRM 2773) e de soja (SRM 2772)

Características	Unidade	Valores certificados *		Valores de referências *		Valores de informação	
		Biodiesel de Soja (SRM 2772)	Biodiesel Blend de Gordura Animal/ Soja (SRM 2773)	Biodiesel de Soja (SRM 2772)	Biodiesel Blend de Gordura Animal/Soja (SRM 2773)	Biodiesel de Soja (SRM 2772)	Biodiesel Blend de Gordura Animal/Soja (SRM 2773)
Teor de Água	% massa	(0,018 ± 0,002)	(0,046 ± 0,002)	-	-	-	-
Densidade a 20°C	g/cm <sup>3</sup>	(0,88132 ± 0,00006)	(0,87628 ± 0,00010)	-	-	-	-
Viscosidade Cinemática a 20°C	mm <sup>2</sup> /s	(6,4310 ± 0,0098)	(7,147 ± 0,021)	-	-	-	-
Viscosidade Cinemática a 30°C	mm <sup>2</sup> /s	(5,0532 ± 0,0069)	(5,543 ± 0,010)	-	-	-	-
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm <sup>2</sup> /s	(4,0843 ± 0,0057)	(4,428 ± 0,009)	-	-	-	-
Enxofre Total	mg/kg	-	(7,39 ± 0,39)	-	(7,39 ± 0,39)	-	-
C10:0	g/kg	-	-	-	(0,20 ± 0,03)	-	-
C12:0	g/kg	-	(0,470 ± 0,017)	-	-	-	-
C14:0	g/kg	(0,755 ± 0,089)	(9,20 ± 0,45)	-	-	-	-
C15:0	g/kg	-	(0,305 ± 0,013)	(0,104 ± 0,012)	-	-	-
C16:0	g/kg	(107 ± 2)	(184 ± 6)	-	-	-	-
C16:1, n-7	g/kg	(1,32 ± 0,18)	(23,3 ± 0,9)	-	-	-	-
C17:0	g/kg	-	-	(1,03 ± 0,02)	-	-	-
C18:0	g/kg	(43,0 ± 2,7)	(87,8 ± 4,2)	-	-	-	-
C18:1, n-9	g/kg	(233 ± 6)	(343 ± 8)	-	-	-	-
C18:1, n-7	g/kg	(14,3 ± 1,5)	(19,4 ± 0,7)	-	-	-	-

Continua

Tabela 25.4 – Continuação

Características	Unidade	Valores certificados *		Valores de referência *	Valores de informação	
		Biodiesel de Soja (SRM 2772)	Biodiesel Blend de Gordura Animal/ Soja (SRM 2773)		Biodiesel de Soja (SRM 2772)	Biodiesel Blend de Gordura Animal/Soja (SRM 2773)
C18:3, n-3	g/kg	(78,2 ± 2)	(25,0 ± 1,0)	-	-	-
C19:0	g/kg	-	-	(0,42 ± 0,05)	-	-
C20:0	g/kg	(3,66 ± 0,52)	(2,28 ± 0,12)	-	-	-
C20:4, n-6	g/kg	-	(2,53 ± 0,09)	-	-	-
C21:0	g/kg	-	-	(0,077 ± 0,008)	-	-
C22:0	g/kg	-	(1,66 ± 0,06)	-	-	-
C23:0	g/kg	-	-	(0,13 ± 0,01)	-	-
Glicerina Livre	g/kg	-	-	(12,1 ± 0,6)	-	-
Monopalmitina	g/kg	-	-	(141 ± 3)	-	-
Tripalmitina	g/kg	-	-	(91,2 ± 3,4)	-	-
Monoleína, Monolinoleína e Monolinolenina	g/kg	-	-	(2668 ± 14)	-	-
Dioleína e Diolinoleína	g/kg	-	-	(1030 ± 23)	-	-
Trioleína	g/kg	-	-	(495 ± 38)	-	-
Metanol	g/kg	-	-	(401 ± 34)	-	-

Continua

Tabela 25.4 – Continuação

Características	Unidade	Valores certificados *		Valores de referências *		Valores de informação	
		Biodiesel de Soja (SRM 2772)	Biodiesel Blend de Gordura Animal/ Soja (SRM 2773)	Biodiesel de Soja (SRM 2772)	Biodiesel Blend de Gordura Animal/Soja (SRM 2773)	Biodiesel de Soja (SRM 2772)	Biodiesel Blend de Gordura Animal/Soja (SRM 2773)
Poder Calorífico	J/g	–	–	(39602 ± 13)	(39660 ± 17)	–	–
Estabilidade a Oxidação	horas	–	–	(4,41 ± 0,27)	(4,46 ± 0,04)	–	–
Cálcio	g/kg	–	–	–	–	0,5	0,1
Cobre	g/kg	–	–	–	–	< 0,2	< 0,2
Ferro	g/kg	–	–	–	–	< 0,2	< 0,2
Fósforo	g/kg	–	–	–	–	< 0,4	< 0,4
Magnésio	g/kg	–	–	–	–	< 0,2	0,05
Potássio	g/kg	–	–	–	–	< 0,1	< 0,1
Sódio	g/kg	–	–	–	–	0,07	0,9
Etanol	g/kg	–	–	–	–	< 0,2	< 5
Glicerina Total	g/kg	–	–	–	–	1520	1660
Monoglicérides	g/kg	–	–	–	–	3620	4110
Diglicérides	g/kg	–	–	–	–	1960	2970
Triglicérides	g/kg	–	–	–	–	1230	1350

 \* Incerteza expandida ( $k=2$ , nível de confiança de 95%)



físico-químicas uniformes e o estudo de estabilidade refere-se à capacidade do MRC em manter o valor de uma determinada propriedade dentro de limites especificados por um período de tempo preestabelecido (ISO, 2006).

## **As normas técnicas brasileiras de especificação do biodiesel**

As Normas Técnicas são documentos estabelecidos por consenso e aprovados por um organismo reconhecido, que fornece, para uso comum e repetitivo, regras, diretrizes ou características para atividades ou seus resultados, visando à obtenção de um grau ótimo de ordenação em um dado contexto. São documentos emitidos por organismos reconhecidos, nacional ou internacionalmente, e em geral surgem da necessidade de padronização ou de uniformização de procedimentos e ações por parte de diferentes agentes ligados ao mercado. No Brasil, o organismo oficial para emissão de normas técnicas é a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). A ABNT é a única e exclusiva representante no Brasil das seguintes entidades internacionais: International Organization for Standardization (ISO) e International Electrotechnical Commission (IEC). Também o é das entidades de normatização regionais: Comissão Pan-americana de Normas Técnicas (Copant) e Associação Mercosul de Normalização (AMN) (ANP, 2011b). A ABNT foi escolhida para secretariar o Comitê de Normalização da ISO sobre biocombustíveis (*White Paper...*, 2007).

Com relação às normas técnicas para o biodiesel, a Comissão de Estudos da ABNT, denominada CE-00.001.62 – Comissão de Estudo de Biodiesel, composta por diversos agentes de instituições públicas e privadas atuantes em entidades reguladoras ou em empresas envolvidas em pesquisa, desenvolvimento e inovação, vem realizando um processo de revisão das normas antigas e desenvolvendo novas normas (ABNT, 2011a).

Atualmente, a normatização nacional do biodiesel resume-se a 25 normas técnicas analíticas brasileiras, das quais 12 foram desenvolvidas no Brasil e 13 foram baseadas em normas internacionais pela CE – Biodiesel da ABNT. A Tabela 25.5 apresenta o quadro geral das normas brasileiras em vigor para biodiesel. Além das normas nacionais, conforme pode ser visualizado na Tabela 25.3, também são amplamente utilizadas normas norte-americanas emitidas pela American Society for Testing and Materials (ASTM) e europeias emitidas pelo Comité Européen de Normalisation (CEN) (ABNT, 2011c).

Tabela 25.5 – Normas técnicas analíticas brasileiras em vigor aplicadas ao biodiesel

Código	Publicação	Título	Escopo	Referência
ABNT NBR 6294	30.4.2008	Determinação de cinza sulfatada	Esta Norma prescreve o método para determinação da cinza sulfatada em óleos lubrificantes novos contendo aditivos e de concentrados de aditivos empregados na formulação de óleos lubrificantes. Estes aditivos usualmente contêm um ou mais dos seguintes metais: bário, cálcio, magnésio, zinco, sódio e estanho. Enxofre, fósforo e cloro também podem estar presentes em forma combinada com outros elementos.	Qualidade
ABNT NBR 7148*	24.7.2006	Determinação da massa específica, densidade relativa e °API - Método do densímetro	Esta Norma estabelece o ensaio para a determinação em laboratório da massa específica, densidade relativa e °API de petróleo, de seus derivados ou misturas destes com produtos não derivados de petróleo que sejam normalmente líquidos e tenham uma pressão de vapor Reid menor ou igual 101,325 kPa (14,696 psi).	Qualidade
ABNT NBR 10441	10.10.2007	Determinação da viscosidade cinemática e cálculo da viscosidade dinâmica	Esta Norma descreve um procedimento específico para a determinação da viscosidade cinemática, $v$ , de produtos líquidos de petróleo, tanto transparentes quanto opacos, pela medição do tempo de escoamento de um determinado volume de líquido que flui sob a ação da força de gravidade, através de um viscosímetro capilar de vidro calibrado. A viscosidade dinâmica, $\eta$ , pode ser obtida pela multiplicação da viscosidade cinemática medida pela massa específica, $\rho$ , do líquido, determinada na mesma temperatura.	Qualidade
ABNT NBR 11346	17.1.2008	Determinação do ponto de névoa	Esta Norma descreve o método para a determinação do ponto de névoa de produtos de petróleo e biodiesel que sejam transparentes em camadas de 40 mm de espessura e com ponto de névoa inferior a 49 °C.	Qualidade
ABNT NBR 14065	30.5.2006	Determinação da massa específica e da densidade relativa pelo densímetro digital	Esta Norma estabelece o ensaio para determinação da massa específica e da densidade relativa de destilados de petróleo e óleos viscosos, que podem ser manuseados normalmente como líquidos a temperaturas de ensaio. Sua aplicação limita-se a líquidos com pressão de vapor abaixo de 80 kPa e viscosidade abaixo de 15 000 mm <sup>2</sup> /s, aproximadamente, à temperatura de ensaio.	Qualidade

*Continua*

Tabela 25.5 – Continuação

Código	Publicação	Título	Escopo	Referência
ABNT NBR 14359	30.5.2005	Determinação da corrosividade - Método da lâmina de cobre	Esta Norma estabelece o método para determinação da corrosividade ao cobre em gasolina de aviação, combustível para turbina de aviação, gasolina automotiva, gasolina natural, querosene, óleo diesel, óleo combustível destilado, óleos lubrificantes, solventes de limpeza (Standard) ou outros hidrocarbonetos cuja pressão de vapor seja menor do que 124 kPa a 37,8 °C.	Qualidade
ABNT NBR 14448	6.4.2009	Determinação do número de acidez pelo método de titulação potenciométrica	Esta Norma descreve os procedimentos para a determinação dos constituintes ácidos em produtos de petróleo, óleos lubrificantes e fluidos hidráulicos solúveis ou parcialmente solúveis em misturas de tolueno e isopropanol. É aplicável à determinação de ácidos cujas constantes de dissociação em água sejam maiores do que $10^{-9}$ ; ácidos extremamente fracos cujas constantes de dissociação sejam menores do que $10^{-9}$ não são detectados. Os sais reagem se suas constantes de hidrólise forem maiores do que $10^{-9}$ . A precisão foi obtida com número de acidez de (0,1 a 150) mg/g KOH.	Qualidade
ABNT NBR 14598	12.4.2007	Determinação do ponto de fulgor pelo aparelho de vaso fechado Pensky-Martens	Esta Norma prescreve o método de determinação do ponto de fulgor de produtos de petróleo pelo aparelho de vaso fechado Pensky-Martens, manual ou automatizado, na faixa de 40 °C a 360 °C.	Qualidade
ABNT NBR 14747	25.3.2008	Determinação do ponto de entupimento de filtro a frio	Esta Norma descreve o método para determinação da temperatura do ponto de entupimento de filtro a frio de óleo diesel, incluindo aqueles contendo aditivos, utilizando o aparelho manual ou o automatizado.	Qualidade
ABNT NBR 15341 *	30.04.2006	Determinação de glicerina livre em biodiesel por cromatografia de mamona por cromatografia em fase gasosa	Esta Norma estabelece o método para determinação de glicerina livre em biodiesel por cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chama. Esta norma é aplicável ao biodiesel metílico ou etílico, proveniente da mamona.	Qualidade

Continua

Tabela 25.5 – Continuação

Código	Publicação	Título	Escopo	Referência
ABNT NBR 15342 *	18.6.2009	Determinação de monoglicérides e diglicérides em biodiesel de mamona por cromatografia gasosa	Esta Norma estabelece o método para determinação de monoglicérides e diglicérides em biodiesel de mamona por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama.	Qualidade
ABNT NBR 15343 *	6.9.2009	Determinação da concentração de metanol e/ou etanol por cromatografia gasosa	Esta Norma estabelece o método para determinação da concentração de metanol e/ou etanol em biodiesel por cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chama.	Qualidade
ABNT NBR 15344 *	17.09.2010	Determinação de glicerina total e do teor de triacilglicérides em biodiesel	Esta Norma estabelece o método para determinação de glicerina total por volumetria em biodiesel, para teores superiores a 0,100 % m/m. No caso de biodiesel de mamona, esta Norma estabelece também o método para determinação do teor de triacilglicérides.	Qualidade
ABNT NBR 15512 *	3.4.2008	Armazenamento, transporte, abastecimento e controle de qualidade de biodiesel e/ou mistura óleo diesel/biodiesel	Esta Norma estabelece os requisitos e procedimentos para o armazenamento, transporte, abastecimento e controle de qualidade de biodiesel e/ou mistura óleo diesel/biodiesel.	Armazenamento
ABNT NBR 15553 *	14.2.2009	Determinação dos teores de cálcio, magnésio, sódio, fósforo e potássio por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES)	Esta Norma especifica um método de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) para detecção dos teores de cálcio, magnésio, sódio e fósforo iguais ou superiores a 1 mg/kg e de potássio igual ou superior a 2 mg/kg nos ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos, denominados doravante como biodiesel. Esta Norma visa avaliar a qualidade do biodiesel, em termos dos teores de cálcio, magnésio, sódio, fósforo e potássio, cuja presença acima de certas concentrações pode alterar a sua utilização como combustível. Estes	Qualidade

Continua

Tabela 25.5 – *Continuação*

Código	Publicação	Título	Escopo	Referência
ABNT NBR 15554	14.2.2008	Determinação do teor de sódio por espectrometria de absorção atômica	Esta Norma visa avaliar a qualidade do biodiesel, em termos do teor de sódio, cuja presença acima de certa concentração pode afetar a sua utilização como combustível. Este elemento pode advir do processo de produção do biodiesel e/ou de eventuais contaminações. Esta Norma descreve um método para detecção do teor de sódio, para concentrações iguais ou superiores a 0,1 mg/kg.	Qualidade
ABNT NBR 15555	14.2.2008	Determinação do teor de potássio por espectrometria de absorção atômica	Esta Norma visa avaliar a qualidade do biodiesel, em termos do teor de potássio, cuja presença acima de certa concentração pode afetar a sua utilização como combustível. Este elemento pode advir do processo de produção do biodiesel e/ou de eventuais contaminações. Esta Norma descreve um método para detecção do teor de potássio, para concentrações iguais ou superiores a 0,50 mg/kg.	Qualidade
ABNT NBR 15556	14.2.2008	Determinação do teor de sódio, potássio, magnésio e cálcio por espectrometria de absorção atômica	Esta Norma visa avaliar a qualidade do biodiesel, em termos dos teores de sódio, potássio, magnésio e cálcio, cuja presença acima de certas concentrações pode afetar a sua utilização como combustível. Estes elementos podem advir do processo de obtenção do biodiesel e/ou de eventuais contaminações. Usualmente, cálcio e magnésio são oriundos da água de lavagem e sódio e potássio do catalisador. Esta Norma descreve o método para detecção dos teores de sódio, potássio, magnésio e cálcio, para concentrações iguais ou superiores a 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,1 mg/kg e 1,0 mg/kg, respectivamente.	Qualidade

*Continua*

Tabela 25.5 – *Continuação*

Código	Publicação	Título	Escopo	Referência
ABNT NBR 15568 *	17.4.2008	Determinação do teor de biodiesel em óleo diesel por espectroscopia na região do infravermelho médio	Esta Norma estabelece as condições para determinação do teor de biodiesel - metílico e/ou etílico - na faixa de 0,5%(v/v) a 30,0%(v/v), em óleo diesel por espectroscopia na região do infravermelho médio.	Qualidade
ABNT NBR 15764 *	23.11.2009	Determinação do teor total de ésteres por cromatografia gasosa	Esta Norma estabelece o método para determinação da concentração total de ésteres em biodiesel por cromatografia gasosa e padronização externa.	Qualidade
ABNT NBR 15771 *	3.12.2009	Determinação de glicerina livre - Método volumétrico	Esta Norma prescreve o método para a determinação de glicerina livre em biodiesel, por volumetria.	Qualidade
ABNT NBR 15867 *	17.9.2010	Determinação do teor de enxofre por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICPOES)	Esta Norma especifica um método de espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICPOES) para detecção do teor de enxofre igual ou superior a 1 mg/kg nos ésteres metílicos/ etílicos de ácidos graxos, denominados doravante biodiesel. Esta norma visa avaliar a qualidade do biodiesel, em termos do teor de enxofre, cuja presença acima de certas concentrações pode afetar a sua utilização como combustível. Este elemento pode advir do processo de obtenção do biodiesel e/ou eventuais contaminações.	Qualidade
ABNT NBR 15908 *	5.2.2011	Determinação da glicerina livre, monoglicérides, diglicérides e triglicérides e glicerina total por cromatografia gasosa	Esta Norma estabelece o método para determinação quantitativa dos teores de glicerina livre, monoglicérides, diglicérides, triacilglicérides e glicerina total por cromatografia gasosa em amostras de biodiesel proveniente de qualquer matéria-prima, incluindo coco, palma e gordura animal. Porém, esta Norma não se aplica ao biodiesel proveniente de óleo de mamona.	Qualidade

*Continua*

Tabela 25.5 – Continuação

Código	Publicação	Título	Escopo	Referência
ABNT NBR 15983	19.10.2011	Determinação da viscosidade dinâmica e massa específica de líquidos por meio de viscosímetro Stabinger (e o cálculo de viscosidade cinemática)	Esta Norma especifica o procedimento para a medição concomitante da viscosidade dinâmica, $\eta$ , e da massa específica, $\rho$ , de produtos de petróleo líquidos e óleos crus, tanto transparentes como opacos. A viscosidade cinemática, $\nu$ , pode ser obtida pela divisão da viscosidade dinâmica, $\eta$ , pela massa específica, $\rho$ , obtida à mesma temperatura do ensaio. O resultado obtido a partir deste método de ensaio depende do comportamento da amostra e destina-se à aplicação em líquidos para os quais, primeiramente, a taxa de tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento sejam proporcionais (comportamento de fluxo newtoniano).	Qualidade
ABNT NBR 14318	Consulta Pública	Determinação do resíduo de carbono Ramsbottom	Esta Norma prescreve o método para determinação quantitativa do resíduo de carbono deixado após evaporação e pirólise de um óleo, e é utilizada para indicar a tendência à formação de coque. Este método é geralmente aplicado a produtos de petróleo relativamente não voláteis, os quais se decompõem parcialmente durante a destilação à pressão atmosférica, e está limitado a amostras que escoam abaixo de 90°C. Este método de ensaio também é utilizado na determinação do resíduo de carbono nos 10 % (v/v) residuais da destilação.	Qualidade
pr. NBR 34:007.02-005	Consulta Pública	Determinação de contaminação total	Esta Norma estabelece o método para determinação da contaminação total de biodiesel, por substâncias não dissolvidas. Esta Norma pode ser aplicada para teores de contaminação de 6 mg/kg até 30 mg/kg. A presença de substâncias não dissolvidas em um sistema de combustível pode acarretar o entupimento prematuro dos filtros e/ou falha no equipamento sendo pois indesejável.	Qualidade

\* Normas Técnicas Analíticas Brasileiras Desenvolvidas pela CE – Biodiesel da ABNT.

As normas técnicas possuem uma aplicabilidade fortemente ligada à tecnologia vigente e ao contexto das regulamentações. Dessa forma, os organismos de normatização constituem comissões técnicas que procuram manter o conjunto de normas o mais atualizado e sintonizado possível, com a tecnologia com as especificações e regulamentações nacionais vigentes.

## **Normas técnicas analíticas desenvolvidas no Brasil para avaliação da qualidade do biodiesel**

Para garantir a qualidade do biodiesel é necessário estabelecer padrões de qualidade, objetivando fixar teores limites dos contaminantes que não venham a prejudicar a qualidade das emissões da queima, bem como o desempenho, a integridade do motor e a segurança no transporte e manuseio. Devem ser monitoradas também possíveis degradações do produto durante o processo de estocagem (Quintella et al., 2009).

A Áustria foi o primeiro país a definir e aprovar os padrões de qualidade para biodiesel, aplicados a ésteres metílicos de colza. Subsequentemente, padrões de qualidade foram sendo estabelecidos em outros países (Sharma; Singh; Upadhyay, 2008). Atualmente o padrão de qualidade americano, elaborado pela ASTM, por meio da norma ASTM D6751, o estabelecido pelo CEN na União Europeia por meio da norma EN 14214 e o estabelecido pela ANP no Brasil pela Resolução ANP n.07 figuram como os mais conhecidos e são geralmente usados como referência ou base para outros padrões (Lôbo; Ferreira; Da Cruz, 2009).

A qualidade do biodiesel pode sofrer variações de acordo com as estruturas moleculares dos seus ésteres constituintes ou devido à presença de contaminantes oriundos da matéria-prima, do processo de produção ou formados durante a estocagem. As estruturas moleculares dos ésteres podem variar tanto no tamanho da cadeia carbônica quanto na quantidade e posição de insaturações ou mesmo devido à presença de substituintes na cadeia, a exemplo da hidroxila ligada à cadeia carbônica do éster alquílico derivado do ácido ricinoléico proveniente da mamona. Contaminantes procedentes da matéria-prima, a exemplo do fósforo, enxofre, cálcio e magnésio, também podem ser encontrados no biodiesel. Dependendo da eficiência do processo de produção do biodiesel, podem estar presentes em maior ou



menor quantidade: glicerina livre, glicerídeos não reagidos, sabões, álcool residual, resíduos de catalisadores e água. A absorção de umidade e os processos de degradação oxidativa durante o armazenamento do biodiesel contribuem para a presença de água, peróxidos e ácidos carboxílicos de baixa massa molecular (Monteiro et al, 2008). Os resultados analíticos aplicados na avaliação da qualidade do biodiesel podem fornecer informações importantes a respeito da seleção da matéria-prima, do processo de fabricação e do armazenamento, bem como do desempenho do biodiesel como combustível e da qualidade das suas emissões (Quintella et al., 2009; Lôbo; Ferreira; Da Cruz, 2009; Monteiro et al, 2008).

Quintella et al. (2009), Lôbo, Ferreira e Da Cruz (2009) e Monteiro et al. (2008) classificaram os métodos analíticos para avaliação da qualidade do biodiesel em quatro grupos, conforme as informações que podem proporcionar, sendo estes: métodos analíticos para determinação de contaminantes provenientes da matéria-prima; métodos analíticos para avaliação do processo produtivo; métodos analíticos para avaliação das propriedades inerentes às estruturas moleculares; métodos analíticos para monitoramento da qualidade do biodiesel durante o processo de estocagem. Esta classificação será utilizada neste texto aplicando-a as normas técnicas analíticas brasileiras.

## **Normas técnicas analíticas desenvolvidas no Brasil para determinação de contaminantes provenientes da matéria-prima**

Algumas características de qualidade do biodiesel estão relacionadas com contaminantes provenientes da matéria-prima. Dentre elas estão o teor de fósforo e enxofre, o teor de cálcio e magnésio e a corrosividade ao cobre.

### **Teor de fósforo e enxofre**

O conteúdo de fósforo no biodiesel é proveniente dos fosfolipídios encontrados tanto nos óleos vegetais quanto na gordura animal. Antes do processo de produção do biodiesel, o óleo ou gordura deverá passar por um

pré-tratamento denominado degomagem, para remoção de grande parte dos fosfolipídios. Neste procedimento são removidas também outras impurezas como ceras, substâncias coloidais e íons metálicos, por meio da lavagem do óleo aquecido com água. A transesterificação de óleo vegetais brutos, ou seja, sem o tratamento prévio de degomagem, resultará na redução do rendimento da reação, bem como na produção de um biodiesel com alto teor de fósforo. Como consequência, as emissões conterão grande quantidade de materiais particulados que poderão influenciar na operação de conversores catalíticos automotivos (Meher; Sagar; Naik, 2006).

O fósforo é determinado no biodiesel via espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), cujos comprimentos de onda indicados são 213,6 nm ou 178,3 nm para o fósforo, podendo ser utilizados outros comprimentos de onda após avaliação técnica do laboratório. A regulamentação brasileira recomenda o método analítico NBR 15553, desenvolvido em 2009, e estabelece o valor máximo de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de fósforo no biodiesel. A amostra deve ser diluída com xileno ou querosene, para permitir a introdução adequada do aerossol no plasma. As soluções de calibração são preparadas a partir de um composto orgânico de cálcio, magnésio, sódio, fósforo e potássio, dissolvido em óleo mineral e diluído numa mistura de xileno e óleo-base. A adição do óleo-base tem como objetivo reduzir as diferenças de viscosidade entre as amostras e as soluções de calibração. As soluções são introduzidas em forma de aerossol em um plasma de argônio indutivamente acoplado e os teores de fósforo são determinados por comparação entre a emissão do elemento presente na solução da amostra e a emissão das soluções de calibração no respectivo comprimento de onda (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

Assim como o fósforo, o enxofre também é um típico veneno de catalisadores e, portanto, afeta os conversores catalíticos. A presença de enxofre no diesel mineral também está associada à emissão de material particulado, danos à saúde e à corrosão de partes do motor, atribuída aos ácidos sulfúrico e sulfônico formados durante a oxidação do combustível (Braun; Appel; Schmal, 2003). O biodiesel possui quantidades muito baixas de enxofre e excelente lubrificidade, portanto pode atuar como aditivo para correção da lubrificidade do diesel mineral. A regulamentação brasileira estabelece o valor máximo de enxofre no biodiesel em  $50 \text{ mg.kg}^{-1}$ , não havendo nenhuma NBR como referência para sua determinação (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

Alternativamente, a NBR 15867, norma técnica desenvolvida recentemente pela Comissão de Estudo de Biodiesel, pode ser aplicada na determinação do teor de enxofre em biodiesel por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (Icpos). A amostra para análise pode ser preparada da mesma forma que a NBR 15553, qual seja, a amostra pode ser diluída em xileno ou querosene com baixo teor de enxofre para permitir a introdução adequada do aerossol no plasma. As soluções para a construção da curva analítica são preparadas a partir de um composto orgânico de enxofre, dissolvido em óleo e diluído numa mistura de xileno em óleo-base. A adição do óleo-base tem como objetivo reduzir as diferenças de viscosidade entre as amostras e as soluções da curva analítica. As soluções são introduzidas em forma de aerossol em um plasma de argônio indutivamente acoplado e o teor de enxofre é determinado por comparação entre a emissão do elemento presente na solução da amostra e a emissão das soluções da curva analítica no respectivo comprimento de onda. O comprimento de onda recomendado é de 180,7 nm.

### **Teor de cálcio e magnésio**

A presença de cálcio e magnésio no biodiesel é oriunda da matéria-prima; todavia seus teores podem ser aumentados durante o processo de purificação. A água de lavagem deve ser tratada antes de ser usada no processo de purificação. A presença de água no biodiesel hidrolisa os ésteres produzindo ácidos graxos e álcool. Os ácidos graxos, na presença dos íons sódio, potássio, cálcio e/ou magnésio, reagirão de modo a formar sal de ácido graxo (sabão) e água. Os sabões formados implicam em formação de depósitos, entupimento em filtros e sistema de injeção prejudicando o desempenho do motor (Santos et al., 2007). No Brasil, o valor máximo regulamentado para a soma das concentrações de cálcio e magnésio é de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ . As normas técnicas analíticas brasileiras indicadas para essas duas características de qualidade são a NBR 15553 e NBR 15556, por meio das quais os metais são determinados por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) ou espectrometria de absorção atômica, cujos comprimentos de onda indicados são 317,933 nm, 396,847 nm, 393,366 nm ou 422,673 nm para o cálcio e 279,553 nm ou 285,213 nm para o magnésio. Outros comprimentos de onda podem ser

utilizados desde que estejam livres das interferências. De acordo com ambas as normas técnicas, a amostra deve ser diluída com xileno ou querosene, para permitir a introdução adequada do aerossol no plasma.

As soluções de calibração são preparadas a partir de um composto orgânico de cálcio e magnésio, dissolvido em óleo mineral e diluído numa mistura de xileno e óleo-base. A adição do óleo-base tem como objetivo reduzir as diferenças de viscosidade entre as amostras e as soluções de calibração. As soluções são introduzidas em forma de aerossol em um plasma de argônio indutivamente acoplado e os teores de cálcio e magnésio são determinadas por comparação entre a emissão do elemento presente na solução da amostra e a emissão das soluções de calibração no respectivo comprimento de onda. O xileno pode ser substituído por cicloexano nos laboratórios que não estejam autorizados a usar solventes aromáticos (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

### **Corrosividade ao cobre**

O ensaio de corrosividade ao cobre é um parâmetro estabelecido para determinar a potencial capacidade do biodiesel em causar corrosão em partes metálicas, que podem ser do motor ou do tanque de armazenamento. Esta propriedade está associada à presença de ácidos ou de compostos de enxofre. A necessidade deste parâmetro tem sido discutida, visto que já existe um método para determinação de acidez e no biodiesel o teor de enxofre é muito baixo. Neste ensaio de corrosividade, uma lâmina de cobre previamente polida é imersa em um volume de biodiesel e mantida aquecida a 50°C, durante um período três horas. No final deste período, a lâmina de cobre é removida, lavada e comparada com os padrões ASTM de corrosão de lâmina de cobre que representam diferentes graus de corrosão, aos quais são atribuídos classes de 1 a 5. No Brasil, a norma indicada é a NBR 14359, e o valor máximo aceitável é grau 1 de corrosão (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

### **Normas técnicas analíticas desenvolvidas no Brasil para avaliação do processo produtivo**

Algumas características de qualidade do biodiesel estão relacionadas com avaliações inerentes à eficiência do processo produtivo. Dentre elas

estão o aspecto, as cinzas sulfatadas, a contaminação total, o resíduo de carbono, o ponto de fulgor, o teor de sódio e potássio, o teor de glicerina livre e total, mono-, di- e triacilglicerídeos, o teor de ésteres o teor de metanol e etanol.

## Aspecto

O aspecto do biodiesel é um parâmetro considerado apenas na regulamentação brasileira, não havendo nenhuma norma técnica como referência para sua avaliação (ANP, 2008). Atualmente, a Comissão de Estudo de Biodiesel, na reunião de abril de 2011, criou um Grupo de Trabalho para elaboração de texto-base sobre o tema Aparência para Biodiesel. Trata-se de uma análise preliminar, na qual se procura verificar a presença de impurezas que possam ser identificadas visualmente com anotação da temperatura do ensaio, como materiais em suspensão, sedimentos ou mesmo turvação na amostra de biodiesel, que podem ser decorrentes da presença de água. Na ausência destes contaminantes, o biodiesel é classificado como límpido e isento de impurezas. O aspecto do biodiesel pode estar também relacionado com características moleculares do biodiesel, bem como com o processo de degradação durante a estocagem.

## Cinzas sulfatadas

A concentração de contaminantes inorgânicos no biodiesel pode ser avaliada com base no teor de cinzas sulfatadas. O método baseia-se na queima da amostra na presença de ácido sulfúrico, a fim de converter as impurezas metálicas em seus sulfatos correspondentes, reduzindo a perda de material por volatilização. Os óxidos de sódio e de potássio, por exemplo, são mais voláteis que os seus sulfatos. Aplica-se este método para determinação de catalisador residual em biodiesel (Na e K), porém outros elementos podem estar presentes, como é o caso do fósforo que é proveniente do óleo não degomado. A presença de catalisador residual no biodiesel pode provocar danos, por abrasão, às peças do motor (Mittelbach, 1996). Neste ensaio, a amostra é inflamada e queimada até que permaneçam somente a cinza e o carbono. Após o resfriamento, o resíduo é tratado com ácido sulfúrico e aquecido a 775°C até que a oxidação do carbono seja completada. A cinza é

então resfriada, novamente tratada com ácido sulfúrico e mantida a 775°C até massa constante. O teor máximo de cinzas sulfatadas em biodiesel regulamentado no Brasil é de 0,020% em massa, sendo a norma técnica de avaliação a NBR 6294 (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

### **Contaminação total**

A massa dos resíduos insolúveis retidos na filtração do biodiesel é utilizada no cálculo do valor do parâmetro denominado contaminação total. A presença de substâncias não dissolvidas em um sistema de combustível pode acarretar o entupimento prematuro dos filtros e/ou falha no equipamento sendo, pois, indesejável. A resolução normativa brasileira adotou esse parâmetro, porém não prevê nenhuma NBR para avaliação desta característica. Atualmente, a Comissão de Estudo de Biodiesel está avaliando o Projeto NBR 34:007.02-005 sobre o tema Determinação de Contaminação Total. Esta Norma estabelece o método para determinação da contaminação total de biodiesel por substâncias não dissolvidas. No ensaio, uma alíquota de 400 mL  $\pm$  12 mL é pesada e filtrada sob vácuo por meio de um filtro previamente tarado. O filtro com o resíduo é lavado, seco e pesado. A contaminação é calculada pela diferença em massa do filtro (inicial e final) e expressa em relação à massa da alíquota em miligrama por quilograma (mg/kg). A legislação adotou o limite máximo de 24 mg/kg para os resíduos retidos (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

### **Resíduo de carbono**

A tendência de formação de depósitos nas câmaras de combustão pode ser avaliada por meio da determinação dos resíduos de carbono. Além dos sabões e dos glicerídeos residuais, contribuem para os valores de resíduo de carbono a água livre, os ácidos graxos livres, os resíduos de catalisadores e as substâncias insaponificáveis oriundas da matéria-prima. Este método consiste em medir a massa de uma pequena quantidade de amostra (0,15 a 1,5 g) transferindo-a quantitativamente para frascos pequenos (3,0 mL), médios (5,0 mL) ou grandes (15 mL). Coloca-se a amostra num frasco de vidro aquecendo a 500°C sob atmosfera de gás inerte (N<sub>2</sub>) e controla-se por um período de tempo e temperatura programável, definido em segundos,

minutos ou horas. A amostra sofre uma reação de aquecimento que provoca o surgimento de substâncias voláteis. Estas são carregadas, e um percentual da amostra original residual é considerado resíduo de carbono. Em resumo, a amostra é evaporada e queimada e o resíduo final é pesado.

Alternativamente, a Comissão de Estudo de Combustíveis e Produtos Especiais desenvolveu a ABNT NBR 14318, norma técnica em consulta pública que prescreve o método para determinação quantitativa do resíduo de carbono deixado após evaporação e pirólise de um óleo, e é utilizada para indicar a tendência à formação de coque. A regulamentação não prevê atualmente nenhuma NBR para avaliação desta característica e estabelece como limite máximo 0,050% em massa (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

## Ponto de fulgor

O ponto de fulgor é definido como a menor temperatura na qual o produto se vaporiza em quantidades suficientes para formar com o ar uma mistura capaz de inflamar-se momentaneamente quando se aplica uma centelha sobre a mesma. Para o biodiesel, os valores de ponto de fulgor são consideravelmente mais elevados que os valores encontrados para o diesel mineral. Para o biodiesel puro o valor do ponto de fulgor encontra-se próximo aos 170°C, porém mínimas quantidades de álcool adicionadas ao biodiesel ocasionam um decréscimo bastante significativo neste valor. Este comportamento torna o ponto de fulgor um parâmetro muito importante quanto à segurança no armazenamento e no transporte, principalmente quando a transesterificação foi realizada com metanol que, além de altamente inflamável, apresenta elevada toxidez. Durante a execução do ensaio, uma amostra é aquecida lenta e constantemente sob agitação contínua, na cuba de ensaio de bronze ou latão com tampa, ambas de dimensões especificadas, e uma fonte de ignição é direcionada ao interior da cuba, a intervalos regulares com a interrupção simultânea da agitação até que ocorra o lampejo dos vapores, sendo esse fenômeno considerado o ponto de fulgor. Quanto aos valores de ponto de fulgor permitidos para o biodiesel, a regulamentação brasileira é a mais tolerante, fixando um valor mínimo de 100°C. Esta determinação é baseada na norma técnica NBR 14598 (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

## Teor de sódio e potássio

A presença de sódio e potássio no biodiesel é oriunda do processo de produção utilizando catálise básica homogênea (Santos et al., 2007). O valor máximo regulamentado, no Brasil, para a soma das concentrações de sódio e potássio é de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ . A norma técnica analítica brasileira indicada para essas duas características de qualidade é a NBR 15553 via espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). A determinação de sódio e potássio em biodiesel também está prevista por espectrometria de absorção atômica (AA), segundo as normas técnicas NBR 15554, NBR 15555 ou NBR 15556. Tanto por ICP-OES ou AA, os comprimentos de onda indicados são 588,995 nm ou 589,592 nm para o sódio e 766,490 nm ou 769,897 nm para o potássio. Outros comprimentos de onda podem ser utilizados desde que estejam livres das interferências. Em todas as NBR, a amostra deve ser diluída com xileno ou querosene, para permitir a introdução adequada do aerossol no plasma. As soluções de calibração são preparadas a partir de um composto orgânico de sódio e potássio, dissolvido em óleo mineral e diluído numa mistura de xileno e óleo-base. A adição do óleo-base tem como objetivo reduzir as diferenças de viscosidade entre as amostras e as soluções de calibração. As soluções são introduzidas em forma de aerossol em um plasma de argônio indutivamente acoplado e os teores de sódio e potássio são determinadas por comparação entre a emissão do elemento presente na solução da amostra e a emissão das soluções de calibração no respectivo comprimento de onda. O xileno pode ser substituído por ciclohexano nos laboratórios que não estejam autorizados a usar solventes aromáticos (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

## Glicerina livre e total, mono-, di- e triacilglicerídeos

A glicerina é um coproduto da reação de transesterificação de óleos e gorduras. A determinação da glicerina residual serve como parâmetro para avaliar a eficiência do processo de purificação do biodiesel. Altas concentrações de glicerina no biodiesel provocam problemas de armazenamento, pois quando o biodiesel é misturado com o diesel de petróleo, observa-se a separação da glicerina nos tanques de estocagem. Problemas como formação de depósitos, entupimento dos bicos injetores do motor e emissões de



aldeídos também estão relacionados com a alta concentração da glicerina no biodiesel (Monteiro et al., 2008).

A glicerina livre residual pode ser facilmente eliminada por meio de lavagens do biodiesel. Embora seja praticamente insolúvel no biodiesel, a glicerina pode ser encontrada dispersa na forma de gotículas. A presença de sabões residuais pode interferir, aumentando a concentração de glicerina no biodiesel devido à formação de emulsões (Sharma; Singh; Upadhyay, 2008). No Brasil, o teor máximo permitido de glicerina livre no biodiesel é de 0,02% em massa. A NBR 15341 é usada para avaliar esta característica quando o biodiesel for oriundo de duas ou mais matérias-primas distintas, sendo uma delas óleo de mamona. Neste ensaio, a amostra é analisada por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama, injetor tipo *on-column*, forno com capacidade para realizar programação de temperatura e coluna capilar polar de sílica fundida (15 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com fase estacionária 50% de cianopropil-fenil e 50% de dimetilpolisiloxano, utilizando-se a técnica de padronização interna para quantificação do teor de glicerina livre presente no biodiesel. O padrão interno utilizado é o etilenoglicol (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

A glicerina combinada, que inclui mono-, di- e triacilglicerídeos, é proveniente da reação incompleta dos triacilglicerídeos, logo, este é um importante parâmetro que pode ser utilizado para avaliar a eficiência da conversão de óleos e gorduras em biodiesel. A glicerina combinada pode ser calculada a partir das concentrações de mono-, di- e triacilglicerídeos, aplicando-se fatores de conversões individuais baseados na massa molar média dos ácidos graxos que participam da composição da matéria-prima (Mittelbach, 1996). Dependendo da concentração em que podem estar presentes no biodiesel, os triacilglicerídeos não reagidos podem aumentar a viscosidade do combustível e, conseqüentemente, reduzir a eficiência da combustão, provocando entupimento do filtro de combustível e formação de depósitos em partes do motor como pistões, válvulas e bicos injetores.

A soma da concentração da glicerina livre com a glicerina combinada é denominada glicerina total. Quanto ao teor de glicerina total, a norma brasileira estabelece um limite máximo de 0,25 % em massa. Quanto à análise de glicerina total em biodieseis de misturas de matérias-primas distintas, dos quais faça parte o óleo de mamona, a regulamentação nacional recomenda a NBR 15342, na determinação quantitativa de mono- e diglicerí-

deos por cromatografia gasosa, e a NBR 15344, na determinação de glicerina total e do teor de triacilglicerídeos por volumetria. De acordo com a NBR 15342 a amostra é analisada por cromatografia gasosa, com detector de ionização por chama, injetor tipo *on-column*, forno com capacidade para realizar programação de temperatura e coluna capilar apolar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,1 µm) para alta temperatura, com fase estacionária 95% de dimetilpolisiloxano e 5% de fenil-metilpolisiloxano, utilizando-se o método de padronização externa para quantificação de monoglicerídeos e diglicerídeos presentes no biodiesel provenientes de mamona. A quantificação da monoricinoleína é realizada por meio da curva analítica utilizando o ricinoleato de etila ou metila como padrão. A tricaprina é usada como padrão para quantificar os outros monoglicerídeos e os diglicerídeos. Os triacilglicerídeos que possam estar presentes nas amostras de biodiesel de mamona devem ser determinados de acordo com a ABNT NBR 15344. A NBR 15344 estabelece o método para determinação de glicerina total, por volumetria, em biodiesel, para teores superiores a 0,100 % m/m; no caso de biodiesel de mamona, estabelece também o método para determinação do teor de triacilglicerídeos. De acordo com a NBR 15344 os glicerídeos presentes no biodiesel são saponificados, gerando glicerina. Toda a glicerina presente reage com o ácido periódico. O excesso deste é determinado por iodometria etilenoglicol (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

Alternativamente, as NBR 15771 e NBR 15908, desenvolvidas recentemente pela Comissão de Estudo de Biodiesel podem ser aplicadas na determinação quantitativa de glicerina livre e glicerina livre e total em amostras de biodiesel. A NBR 15771 prescreve o método para a determinação de glicerina livre em biodiesel, por volumetria. Experimentalmente, a glicerina extraída do biodiesel reage com ácido periódico e o excesso do ácido é determinado por iodometria, técnica semelhante à NBR 15344. Por outro lado, a NBR 15908 estabelece o método para determinação quantitativa dos teores de glicerina livre e total, mono-, di- e triglicerídeos simultaneamente por cromatografia gasosa em amostras de biodiesel proveniente de qualquer matéria-prima, exceto óleo de mamona. Neste ensaio, a amostra é injetada em um cromatógrafo a gás com detector de ionização por chama, injetor tipo *on-column*, forno com capacidade para realizar programação de temperatura e coluna capilar apolar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm x 0,1 µm) para alta temperatura, com fase estacionária 95% de dimetilpolisiloxa-

no e 5% de fenil-metilpolisiloxano, após ser silanizada com o N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA).

A identificação dos componentes da amostra é realizada por comparação com os tempos de retenção de quatro padrões de referência (glicerina, monoleína, dioleína e trioleína). A quantificação é realizada por meio de curvas analíticas com padronização interna. Para quantificar a glicerina, deve ser utilizado o etilenoglicol como padrão interno e, para os glicerídeos, a tricaprina. O teor de glicerina total é obtido a partir da soma dos teores de glicerina livre e glicerina combinada (ABNT, 2011c).

### Teor de éster

O teor de éster é o principal parâmetro de qualidade do biodiesel. Os ésteres são o biodiesel propriamente dito, ou seja, enquanto uma gasolina perfeita seria composta apenas por octano, um biodiesel perfeito seria exclusivamente uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos. Portanto, quanto maior o teor de éster melhor é o biodiesel. A alta pureza do biodiesel, ou seja, a alta quantidade de ésteres promove uma combustão mais limpa e eficiente, melhor rendimento do motor, gases de exaustão mais limpos e maior tempo de vida útil do motor. Cuidado deve ser tomado com o uso do biodiesel, em virtude das características solventes dos ésteres, com relação a mangueiras, borrachas, elastômeros, pinturas e demais polímeros, pois o biodiesel pode dissolvê-los. Esse problema é proporcionalmente reduzido quando se utilizam misturas de biodiesel com diesel.

O teor de ésteres metílicos ou etílicos no biodiesel é um parâmetro previsto na legislação brasileira, cuja porcentagem mínima exigida de éster é de 96,5 % em massa. Na Resolução ANP n.07, é recomendada a NBR 15342, cujo escopo foi alterado e não contempla mais teor de ésteres, sendo hoje aplicável apenas a determinação de monoglicerídeos e diglicerídeos em biodiesel de mamona, conforme cita a Tabela 25.5 (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

Alternativamente, a NBR 15764, norma técnica desenvolvida recentemente pela Comissão de Estudo de Biodiesel, pode ser aplicada na determinação da concentração total de ésteres em biodiesel. De acordo com a norma, a amostra é analisada por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama, injetor tipo *on-column*, forno com capacidade para realizar programação de temperatura e coluna capilar apolar de sílica fundi-

da (30 m x 0,25 mm x 0,1  $\mu$ m) para alta temperatura, com fase estacionária 95% de dimetilpolisiloxano e 5% de fenil-metilpolisiloxano, utilizando-se o método de padronização externa para quantificação dos ésteres presentes no biodiesel, independentemente do tipo de matéria-prima utilizado na produção.

A quantificação é realizada por meio de uma curva analítica feita com estearato de metila ou etila, exceto no biodiesel de mamona e naqueles em que há predominância de ésteres de ácidos graxos com cadeia carbônica menor que  $C_{14}$ , usando clorofórmio como solvente. Para amostras de biodiesel de mamona, além do esterato de metila ou etila, utiliza-se também um padrão com ricinoleato de metila ou etila para a quantificação desse éster na amostra. Para amostras de biodiesel que apresentam ésteres de ácidos graxos com cadeia carbônica menor que  $C_{14}$ , majoritariamente, além do estearato de metila ou etila, utiliza-se um padrão com laurato de metila ou etila para quantificação desses ésteres na amostra (ABNT, 2011c).

## Metanol e etanol

O teor de álcool no biodiesel pode ser utilizado também para avaliar o processo de purificação do biodiesel, visto que o álcool presente no biodiesel é proveniente do processo de produção. Altos teores de álcool reduzem drasticamente o ponto de fulgor (aumenta a periculosidade durante o armazenamento e transporte), o número de cetano, a lubricidade e podem levar à corrosão em peças de alumínio e zinco. A concentração de álcool é determinada pelo método cromatográfico estabelecido na NBR 15343, tanto para a determinação de metanol quanto de etanol.

A amostra é analisada por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama, injetor *split-splitless*, forno com capacidade para realizar programação de temperatura e coluna capilar apolar de sílica fundida (30 m x 0,32 mm x 3  $\mu$ m), com fase estacionária 100% de dimetilpolisiloxano, utilizando-se o método de padronização interna para quantificação do teor de metanol e/ou etanol presentes no biodiesel. O padrão interno utilizado é o *terc*-butanol. Na normativa brasileira, estabelecida pela ANP, tanto o teor de metanol como de etanol é fixado em 0,20% em massa, no entanto, a determinação de álcool é dispensada no caso de valores de pontos de fulgor superiores a 130°C (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

## **Normas técnicas analíticas desenvolvidas no Brasil para avaliação das propriedades inerentes às estruturas moleculares**

Algumas propriedades do biodiesel estão relacionadas com as estruturas moleculares dos seus ésteres alquílicos constituintes. Neste contexto, características analíticas foram adotadas visando o controle deste efeito sobre o desempenho do biodiesel. Dentre estas estão a massa específica, a viscosidade cinemática, o índice de iodo, o número de cetano, o ponto de névoa, o ponto de entupimento de filtro a frio e o ponto de fluidez.

### **Massa específica a 20°C**

A massa específica do biodiesel está diretamente ligada à estrutura de suas moléculas. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica do éster alquílico, maior será a massa específica, sendo que este valor decresce com o aumento do número de insaturações presentes na molécula. Biodieseis que apresentam massa específica elevada oferecem maior energia ao motor. Entretanto, biodieseis fora das especificações provocam problemas de entupimento do sistema de injeção dos veículos e formação de depósitos na câmara de combustão. Comparado com o diesel mineral, o biodiesel apresenta maior massa específica. Na Resolução ANP n.07, as normas técnicas para análise da massa específica do biodiesel são as mesmas aplicadas aos derivados de petróleo. A regulamentação nacional estabelece valores de massa específica entre 850 e 900 kg.m<sup>-3</sup>, determinadas através da NBR 7148, que utiliza hidrômetros de vidro, e NBR 14065, que emprega equipamentos digitais.

Durante a execução do ensaio segundo a NBR 7148, a amostra deve atingir a temperatura ambiente e, a seguir, ser transferida para uma proveta aproximadamente na mesma temperatura. Mergulha-se o hidrômetro de vidro adequado na amostra (que deverá estar também em uma temperatura similar), deixando-o flutuar. Após alcançar a temperatura de equilíbrio, efetua-se a leitura da escala e anota-se a temperatura da amostra. Faz-se a correção da massa específica por meio da tabela para temperatura de referência (20°C). Caso necessário, a proveta contendo a amostra pode ser colocada em um banho termostático, para evitar variações excessivas de temperatura durante o ensaio.

Na execução do ensaio segundo a NBR 14065, um pequeno volume de amostra líquida é introduzido em um tubo oscilante em formato de U e a mudança de frequência de oscilação causada pela mudança na massa do tubo é determinada, em combinação com dados de calibração do equipamento para calcular a massa específica da amostra. A Resolução ANP n.07 estabelece ainda que o biodiesel produzido tenha um prazo máximo de um mês, a contar da data de certificação, para ser comercializado. Passado este prazo, deve ser realizada uma nova análise da massa específica, e havendo diferença inferior a  $3,0 \text{ kg.m}^{-3}$  em relação ao valor do certificado, deverão ser novamente ensaiados o teor de água, o índice de acidez e a estabilidade à oxidação. Caso a diferença seja superior a  $3,0 \text{ kg.m}^{-3}$ , deverão ser reavaliados todos os parâmetros de qualidade estabelecidos na Resolução ANP n.07 (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

### **Viscosidade cinemática a 40°C**

A viscosidade cinemática é a medida da resistência do biodiesel ao escoamento. A viscosidade do biodiesel aumenta com o comprimento da cadeia carbônica e com o grau de saturação e tem influência no processo de queima na câmara de combustão do motor. A viscosidade está diretamente ligada à lubrificidade, ou seja, quanto maior seu valor, melhor a lubrificidade do biodiesel. Entretanto, a alta viscosidade (acima do limite estabelecido pela ANP) ocasiona heterogeneidade na combustão do biodiesel, perda no rendimento e na potência do motor, devido à diminuição da eficiência de atomização na câmara de combustão, ocasionando a deposição de resíduos nas partes internas do motor. Outra situação importante para que este parâmetro seja avaliado é durante a armazenagem, uma vez que a viscosidade aumenta de forma diretamente proporcional à presença de produtos da degradação oxidativa do biodiesel, de sabões residuais e de glicérides não reagidos (mono-, di- e triacilglicérides). Estes contaminantes podem, portanto, ser monitorados indiretamente por meio da determinação da viscosidade cinemática.

A regulamentação nacional estabelece valores de viscosidade cinemática entre  $3,0$  e  $6,0 \text{ mm}^2/\text{s}$ , determinados através da NBR 10441. Por meio desta norma técnica, é determinado o tempo, em segundos, de um volume fixo de líquido que escoa por gravidade através do capilar de um viscosímetro calibrado, a uma temperatura rigorosamente controlada, neste caso,  $40^\circ\text{C}$ .

A viscosidade cinemática é o produto do tempo de escoamento medido pela constante de calibração do viscosímetro. O resultado da viscosidade cinemática é a média de duas determinações aceitáveis (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

Alternativamente, a ABNT NBR 15983, norma técnica desenvolvida recentemente pela Comissão de Estudo de Óleos Lubrificantes e de Biodiesel, pode ser aplicada simultaneamente para a determinação da viscosidade dinâmica e cinemática e da massa específica de biodiesel. Na execução do ensaio, a amostra é introduzida nas células de medição que estão a uma temperatura estritamente controlada e conhecida. As células de medição consistem em um par de cilindros concêntricos rotacionais e um tubo em formato de U oscilante. A viscosidade dinâmica é determinada a partir da velocidade rotacional de equilíbrio entre o cilindro interno sob a influência da tensão de cisalhamento da amostra de ensaio, e um freio de corrente parasita em conjunto com os dados de ajuste. A massa específica é determinada pela frequência de oscilação do tubo em formato de U em conjunto com os dados de ajuste. A viscosidade cinemática é obtida pela divisão da viscosidade dinâmica pela massa específica obtida à mesma temperatura do ensaio (ABNT, 2011c).

## **Índice de iodo**

O índice de iodo indica o grau quantitativo de insaturações no biodiesel e é dependente do tipo de matriz utilizada. O número de insaturações não tem apenas efeito nos valores de densidade e de viscosidade dos biodieseis, mas também é de grande importância na estabilidade oxidativa dos biodieseis como será exposto adiante. Este método consiste no tratamento da amostra de biodiesel com iodo em excesso, que reage com as duplas ligações. O iodo não reagido é, então, titulado com tiosulfato de sódio e o resultado expresso como gramas de iodo que reagem com as insaturações em 100 g de amostra. A regulamentação brasileira não prevê atualmente nenhuma NBR para avaliação desta característica, bem como não estabelece nenhum limite máximo (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

## **Número de cetano**

O número de cetano é indicativo do tempo de atraso na ignição de combustíveis para motores do ciclo diesel, logo, reflete a qualidade da ignição do combustível. Quanto maior o número de cetano mais curto será o tem-

po de ignição, de modo que um combustível que apresenta alto número de cetano inflama com mais facilidade quando é injetado dentro do motor produzindo uma combustão mais eficiente. Em comparação com o diesel, o biodiesel geralmente apresenta um número de cetano mais alto. Isso se deve ao fato de o biodiesel apresentar uma porcentagem maior de oxigênio na sua composição. Quanto mais saturada e longa a cadeia carbônica do éster, maior é o número de cetano.

O ensaio para avaliação do número de cetano é realizado em um motor de bancada de quatro tempos (*Cooperative Fuel Research – CRF*), com um único cilindro e ignição por compressão, projetado para testes de amostras de combustíveis usados em motores diesel, ou pela avaliação usando um analisador automático (*Ignition Quality Tester – IQT*) que determina a qualidade da ignição por meio da medição direta do atraso de ignição do biocombustível alimentado através de um bico injetor em uma câmara, com temperatura e pressão controlados automaticamente. No Brasil, a regulação não estabelece um valor mínimo ou máximo para o número de cetano no biodiesel, sendo solicitado somente o registro do valor mensurado. Da mesma forma, não está prescrita atualmente nenhuma NBR para avaliação desta característica (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

### **Ponto de névoa, ponto de entupimento de filtro a frio e ponto de fluidez**

Em regiões com baixas temperaturas o biodiesel pode formar cristais e comprometer desde a operação de carga e descarga, em distribuidoras, até o próprio bombeamento do tanque de combustível para os bicos injetores, ocasionando problemas na partida do motor. A partir deste comportamento, foram elaborados três ensaios de laboratório: ponto de névoa, que é a temperatura do combustível, em um processo de resfriamento, no qual se observa a formação dos primeiros cristais; ponto de entupimento de filtro a frio, que é a temperatura em que o combustível perde a filtrabilidade quando resfriado; e ponto de fluidez, que é a temperatura em que o combustível perde sua fluidez quando sujeito a resfriamento sob determinadas condições.

Essas informações são de grande importância para avaliar a aplicabilidade do combustível em regiões de clima frio. Quanto maior for o tamanho da cadeia e/ou o caráter saturado das moléculas do biodiesel, mais altos serão os



valores destes parâmetros. É de se esperar, portanto, que o biodiesel originário de gordura animal apresente valores mais elevados que o biodiesel proveniente de gordura vegetal, devido ao seu alto teor de ácidos graxos saturados. Na análise de um mesmo biodiesel, verifica-se que o ponto de névoa apresentará sempre os valores maiores de temperatura, quando comparado com ponto de entupimento e ponto de fluidez, podendo, então, ser considerado como o mais restritivo. O ponto de fluidez será então o menos restritivo.

No Brasil é estabelecida somente a determinação do ponto de entupimento de filtro a frio, conforme a norma técnica NBR 14747, exceto para biodiesel oriundo apenas de mamona. O valor máximo de 19°C estabelecido na regulamentação brasileira é aplicável para as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e para o estado da Bahia, devendo ser anotado para as demais regiões. Neste ensaio, uma alíquota é resfriada sob condições específicas e, em intervalos de 1°C, é sugada, à pressão reduzida controlada, para uma pipeta através de um filtro de malha metálica padronizado. Este procedimento é repetido até que a quantidade de cristais de parafina que se separaram da solução seja suficiente para interromper ou reduzir a circulação da amostra, de modo que o tempo necessário para preencher a pipeta ultrapasse 60 segundos ou que o líquido deixe de retornar completamente para o recipiente de ensaio, antes de ser resfriado em mais 1°C. A temperatura indicada na qual a última filtração foi iniciada é registrada como o ponto de entupimento de filtro a frio (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

## **Normas técnicas analíticas desenvolvidas no Brasil para monitoramento da qualidade do biodiesel durante o processo de armazenamento**

Algumas características de qualidade do biodiesel estão relacionadas com o processo de armazenamento. Dentre elas estão a estabilidade à oxidação a 110°C, o teor de água e o índice de acidez.

### **Estabilidade à oxidação a 110°C**

A estabilidade à oxidação ou estabilidade oxidativa reflete o tempo que o biodiesel leva para se degradar formando compostos orgânicos vo-

lâteis. A estabilidade oxidativa do biodiesel está diretamente relacionada com o grau de insaturação dos ésteres alquílicos presentes, como também com as posições das duplas ligações na cadeia carbônica. A concentração de ésteres alquílicos com alto grau de insaturação varia de acordo com a matéria-prima utilizada na produção do biodiesel. Quanto maior o número de insaturações (maior índice de iodo), mais susceptível está a molécula à degradação tanto térmica quanto oxidativa, formando produtos insolúveis que ocasionam formação de depósitos e entupimento do sistema de injeção de combustível do motor.

A alta temperatura e a exposição ao ar são fatores importantes que afetam a estabilidade do biodiesel, sendo esta mais significativamente afetada quando os dois fatores estão presentes ao mesmo tempo. A presença de água no biodiesel pode também promover a oxidação (oxidação hidrolítica), no entanto, em menor extensão. A viscosidade, o índice de peróxido e, principalmente, o período da indução (método Rancimat) são parâmetros que podem ser utilizados para o monitoramento da degradação oxidativa do biodiesel durante o período de estocagem.

No método Rancimat, uma amostra de biodiesel é mantida em um vaso de reação, à temperatura de 110°C e sob um fluxo de ar. Nesse momento começam a se formar os peróxidos, que são os principais produtos formados na primeira etapa de oxidação do biodiesel. Com o processo de oxidação continuada, são formados compostos orgânicos voláteis, dentre estes, ácidos orgânicos de baixa massa molecular. Estes compostos são transportados pelo fluxo de ar para outro recipiente contendo água destilada, onde a presença dos ácidos orgânicos é então detectada pelo aumento da condutividade no sistema. O tempo decorrente até a detecção dos ácidos orgânicos é denominado de período de indução. No Brasil, a regulação atualmente estabelece um valor mínimo de período de indução de 6 horas para estabilidade oxidativa no biodiesel, porém não prescreve nenhuma NBR para avaliação desta característica (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

## Teor de água

A água, além de promover a hidrólise do biodiesel resultando em ácidos graxos livres, também está associada à proliferação de micro-organismos e corrosão em tanques de estocagem com deposição de sedimentos.

Como o biodiesel apresenta certo grau de higroscopicidade, o simples contato com a umidade do ar pode elevar consideravelmente o seu teor de água, tornando imprescindível o monitoramento deste parâmetro durante o armazenamento.

O método consiste na determinação do teor de água em biodiesel por titulação coulométrica de Karl Fischer, técnica mais seletiva e sensível para a determinação do teor de água. A amostra é titulada com a solução de Karl Fischer até atingir o ponto final indicado pelo eletrodo de platina. O funcionamento da titulação coulométrica de Karl Fischer é baseado na oxidação de  $\text{SO}_2$  por iodo na presença de água e de um solvente (geralmente metanol) entre outras substâncias. O equipamento possui dois eletrodos. O eletrodo gerador é responsável pela geração de iodo a partir da oxidação do iodeto formado pela reação de Karl Fischer. A quantidade de iodo gerada é equivalente à quantidade de água presente na amostra; quanto maior a quantidade de água presente no biodiesel mais iodo é gerado. O eletrodo indicador é responsável por detectar o ponto final da análise. Por meio da quantidade de carga elétrica necessária para a geração de iodo é possível calcular a concentração de água. No Brasil, a regulação atualmente estabelece um valor máximo de  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (ppm) para o teor de água no biodiesel, porém não prescreve nenhuma NBR para avaliação desta característica (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

## Índice de acidez

A alta acidez do biodiesel pode levar à sua degradação mais rápida, e acelerar a corrosão do motor e dos sistemas de injeção. O monitoramento do índice de acidez ou número de acidez no biodiesel é de grande importância também durante a estocagem, na qual a alteração nos valores de acidez pode significar a presença de água e/ou degradação oxidativa. No Brasil, a regulação atualmente estabelece um valor máximo de  $0,5 \text{ mg KOH/g}$  na determinação do índice de acidez no biodiesel. O método utilizado é o da NBR 14448, no qual o índice de acidez é determinado por meio de titulação potenciométrica. A amostra é dissolvida em uma mistura de tolueno e isopropanol contendo uma pequena quantidade de água e titulada potenciometricamente com solução de hidróxido de potássio em isopropanol, usando um eletrodo indicador de vidro e um eletrodo de referência ou, como

alternativa, um eletrodo combinado. As leituras são plotadas manualmente ou automaticamente contra os respectivos volumes de solução titulante e os pontos finais são tomados em inflexões bem definidas na curva resultante (ANP, 2008; ABNT, 2011c).

## Considerações finais

Apesar da grande evolução observada até o presente momento nas normas empregadas na caracterização e controle de qualidade do biodiesel, continua havendo uma constante demanda por novas especificações e regulamentações, o que requer a manutenção de um conjunto de normas técnicas o mais atualizado e sintonizado possível. Este fato pode ser observado pela atuação ativa do Comitê de Estudo de Biodiesel da Associação Brasileira de Normas Técnicas.

Algumas normas técnicas analíticas para caracterização e controle de qualidade do biodiesel são clássicas e bem estabelecidas para a análise de diesel mineral; as demais são as empregadas há muito tempo na determinação da qualidade de óleos e gorduras. Cabe ressaltar que diversas características ainda não estão contempladas com normas técnicas nacionais, e sim internacionais. Desta forma, pesquisas têm sido continuamente realizadas, na busca de novas normas técnicas, cada vez mais rápidas e, na medida do possível, de custo cada vez menor.

Dentro do contexto de desenvolvimento de MRC para biodiesel, é possível observar que são de grande importância para o Brasil. O uso dos MRC de biodiesel, quais sejam, *blend* de gordura animal/soja e biodiesel de soja, desenvolvidos por meio de um estudo colaborativo entre o Inmetro e Nist, contribui para a produção de biodiesel de qualidade comprovada, colaborando com a transformação do biodiesel produzido no Brasil em *commodity* e possibilitando a liderança do país nesse segmento. Além de incrementar o comércio do biodiesel, o uso do MRC de biodiesel garantirá a rastreabilidade e a qualidade dos resultados nas medições analíticas das características de qualidade do biodiesel, contribuindo para um comércio mais justo e confiável. Porém, vale destacar a necessidade de MRC que contemplem uma maior diversidade de características físico-químicas de biodiesel com valores certificados.

## Referências bibliográficas

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Comissões de Estudos Especiais. Rio de Janeiro: ABNT, 2011a. Disponível em: <http://www.abnt.org.br>. Acesso em: 30 abril 2011.
- . Informações gerais da *homepage*. Rio de Janeiro: ABNT, 2011b. Disponível em: <http://www.abnt.org.br>. Acesso em: 30 abril 2011.
- . Normas Técnicas para Biodiesel. Rio de Janeiro: ABNT, 2011c. Disponível em: <http://www.abntcatalogo.com.br>. Acesso em: 30 abril 2011.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). Resolução ANP nº 41, de 24 de novembro de 2004. Fica instituída a regulamentação e obrigatoriedade de autorização da ANP para o exercício da atividade de produção de biodiesel. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 9 dez. 2004.
- . Resolução ANP nº 07, de 19 de março de 2008. Fica estabelecida no Regulamento Técnico ANP, parte integrante desta Resolução, a especificação do biodiesel a ser comercializado pelos diversos agentes econômicos autorizados em todo o território nacional. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 março 2008.
- . Resolução ANP n.42, de 16 de dezembro de 2009. Ficam estabelecidas, consoante as disposições contidas no Regulamento Técnico ANP nº 8/2009, parte integrante desta Resolução, as especificações do óleo diesel de uso rodoviário, para comercialização pelos diversos agentes econômicos em todo o território nacional. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 dez. 2009.
- . Informações gerais da *homepage*. Brasília: Governo Federal, 2011. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: 30 abril 2011.
- ANTONIOSI, N. R. F.; MENEZES, R. S. Políticas Públicas: Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis. In: 4º CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE BIODIESEL & 7º CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2010, Belo Horizonte - MG. *Anais...* Lavras: UFLA, v.3, p.1823-4, 2010.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). ASTM D6751: Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels. West Conshohocken: ASTM, 2011.
- BONOMI, A. Projeto de Políticas Públicas para o Etanol: Qualidade e Normalização do Etanol. In: CORTEZ, L. A. B. (Coordenador). *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. São Paulo: E. Blücher, 2010.
- BRAUN, S.; APPEL, L. G.; SCHMAL, M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas a diesel – a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. *Química Nova*, v.27, n.3, p.472-82, 2003.
- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Informações gerais da *homepage*. Brasília: Governo Federal, 2011. Disponível em: <http://www.mec.gov.br>. Acesso em: 30 abril 2011.

- CASA CIVIL DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. Decreto de 2 de julho de 2003. Institui Grupo de Trabalho Interministerial encarregado de apresentar estudos sobre a viabilidade de utilização de óleo vegetal - biodiesel como fonte alternativa de energia, propondo, caso necessário, as ações necessárias para o uso do biodiesel. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 3 jul. 2003.
- \_\_\_\_\_. Decreto de 23 de dezembro de 2003. Institui a Comissão Executiva Interministerial encarregada da implantação das ações direcionadas à produção e ao uso de óleo vegetal - biodiesel como fonte alternativa de energia. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 24 dez. 2003.
- \_\_\_\_\_. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 14 jan. 2005.
- CELAB (Projeto Confiabilidade em Ensaios Laboratoriais de Biocombustíveis). Informações gerais da *homepage*. Florianópolis: Fundação CERTI e IBP, 2011. Disponível em: <http://www.celab.org.br>. Acesso em: 30 abril 2011.
- CEN (Comité Européen de Normalisation). EN 14214: Automotive Fuels - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines - Requirements and Test Methods. Brussels: CEN, 2008.
- CNPE (Conselho Nacional de Política Energética). Resolução nº. 3, de 23 de setembro de 2005. Reduz o prazo de que trata o § 1º do art. 2º da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005 e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 28 set. 2005.
- CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Informações gerais da *homepage*. Brasília: Governo Federal, 2011. Disponível em: <http://www.cnpq.br>. Acesso em: 30 abril 2011.
- DUARTE, A. Contrata-se. *Revista BiodieselBR*, v.18, p.48-51, 2010.
- FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos). Informações gerais da *homepage*. Brasília: Governo Federal, 2011. Disponível em: <http://www.finep.gov.br>. Acesso em: 30 abril 2011.
- GONÇALVES, M. A. et al. Caracterização e certificação de parâmetros de qualidade para o desenvolvimento de material de referência certificado de biodiesel. In: 3º CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE BIODIESEL, 2009, Brasília - DF. *Anais...* Brasília: Hotel Brasília Alvorada, p.145-6, 2009.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Informações gerais da *homepage*. Brasília: Governo Federal, 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br>. Acesso em: 30 abril 2011.
- ISO (International Organization for Standardization). ISO Guide 35: Reference materials – General and statistical principles for certification. Geneva: ISO, 2006.
- LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; DA CRUZ, R. S. Biodiesel: Parâmetros de Qualidade e Métodos Analíticos. *Química Nova*, v.32, n.6, p.1596-1608, 2009.
- MEC (Ministério da Educação). Informações gerais da *homepage*. Brasília: Governo Federal, 2011. Disponível em: <http://www.mec.gov.br>. Acesso em: 30 abril 2011.

- MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.10, n.3, p.248-68, 2006.
- MENEZES, R. S.; NETO, P. C.; RAMOS, G. L. Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Biodiesel: A Experiência da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. In: 4º CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE BIODIESEL & 7º CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2010, Belo Horizonte - MG. *Anais...* Lavras: UFLA, v.3, p.1761-2, 2010.
- MITTELBAACH, M. Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: Specifications and quality control of biodiesel. *Bioresource Technology*, v.56, n.1, p.7-11, 1996.
- MONTEIRO, M. R. et al. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta*, v.77, n.2, p.593-605, 2008.
- PAFFRATH, C.; DULLIUS, A. A Evolução do Conhecimento Brasileiro sobre a Temática do Biodiesel e o Avanço do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. In: 4º CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE BIODIESEL & 7º CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2010, Belo Horizonte - MG. *Anais...* Lavras: UFLA, v.3, p.1799-800, 2010.
- PNPB (Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel). Portal do PNPB. Informações gerais da *homepage*. Brasília: Governo Federal (Comissão Executiva Interministerial (Ceib), 2011. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br>. Acesso em: 30 abril 2011.
- QUINTELLA, C. M. et al. Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. *Química Nova* v.32, n.3, p.793-808, 2009.
- RBTB (Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel). Informações gerais da *homepage*. Brasília: Governo Federal, 2011. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/rede.html>. Acesso em: 30 abril 2011.
- RODRIGUES, F. Investindo no Amanhã. *Revista BiodieselBR*, v.23, p.32-6, 2011.
- SANTOS, E. J. et al.. Simultaneous determination of Ca, P, Mg, K and Na in biodiesel by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry with internal standardization after multivariate optimization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v.22, p.1300-3, 2007.
- SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). Biodiesel Cartilha Sebrae. Disponível em: [http://www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha\\_Sebrae.pdf](http://www.biodiesel.gov.br/docs/Cartilha_Sebrae.pdf). Acesso em: 30 abril 2011.
- SHARMA, Y.C.; SINGH, B.; UPADHYAY, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel*, v.87, p.2355-73, 2008.
- SISTEC (Sistema Nacional de Informações da Educação Profissional e Tecnológica). Informações gerais da *homepage*. Brasília: Governo Federal, 2011. Disponível: <http://www.mec.gov.br>. Acesso em: 30 abril 2011.

- STRADIOTTO, N. R. et al. Qualidade do Etanol Combustível: Materiais de Referência e Métodos de Análise. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.) *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. São Paulo: E. Blücher, 2010.
- WHITE PAPER ON INTERNATIONALLY COMPATIBLE BIOFUEL STANDARDS – Tripartite Task Force Brazil, Europe Union and United States, 31 dez. 2007. Disponível em: [http://www.abnt.org.br/imagens/destaques/Biocombustivel\\_WHITE\\_PAPER\\_IBCS.pdf](http://www.abnt.org.br/imagens/destaques/Biocombustivel_WHITE_PAPER_IBCS.pdf). Acesso em: 30 abril 2011.





## Novos métodos analíticos para avaliação da qualidade do bioetanol combustível

*Paula G. Fenga, Josiel J. Silva, Marcelo F. de Oliveira,  
Adelir A. Saczk, Leonardo L. Okumura,  
André L. dos Santos, Regina M. Takeuchi,  
Maria Valnice B. Zanoni, Nelson R. Stradiotto*

A utilização de bicomcombustíveis, principalmente em veículos motorizados, constitui atualmente uma alternativa de grande viabilidade em diversas matrizes energéticas de vários países. Desta forma, o bioetanol, etanol derivado da biomassa, destaca-se pela possibilidade de ser utilizado como combustível propriamente dito (hidratado) e também como aditivo antidetonante (anidro) na gasolina. A avaliação da qualidade do bioetanol reveste-se de enorme importância, tanto para os processos de produção quanto para os mercados consumidores. Os parâmetros que definem a qualidade deste biocombustível são especificados por meio de regulamentos técnicos elaborados pelas agências reguladoras nacionais e internacionais. Além disso, estas agências também estabelecem os métodos que devem ser utilizados para verificar estes parâmetros. As evoluções das especificações decorrem de vários fatores, como a *performance* dos motores, a capacidade técnica de produção e análise e a preservação do meio ambiente, entre outros, e estes fatores impulsionam o desenvolvimento de novos métodos de análise para o bioetanol.

Após 1998, houve um salto considerável no número de trabalhos científicos publicados sobre métodos de análise para este biocombustível. Estes trabalhos empregam diferentes técnicas instrumentais, como espectrometria de emissão e absorção atômica, espectrofotometria no ultravioleta e no visível, eletroforese capilar, cromatografia líquida e gasosa e técnicas

eletroquímicas, entre outras, alcançando desempenho analítico, em muitos casos, equivalentes às técnicas oficiais de análise. Neste capítulo serão descritos estes novos métodos de análise, para espécies orgânicas e inorgânicas presentes no bioetanol, mostrando as diversas alternativas de métodos para o controle da qualidade deste tão importante biocombustível.

## Qualidade do bioetanol combustível

O setor sucroenergético brasileiro, no qual se destaca a cana-de-açúcar como uma biomassa de alto teor energético para a produção de bioetanol combustível, vive em contínua evolução tecnológica desde a década de 1970. Em 2008/09, a região Sudeste foi responsável por aproximadamente 70% da safra brasileira com uma produção de cerca de 20 bilhões de litros de bioetanol, destinados ao mercado nacional e internacional (Única, s. d.).

O azeótropo, formado no processo de produção do etanol brasileiro via fermentação de açúcares por ação de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, é responsável pela formação do bioetanol Hidratado Combustível (BHC), cujo teor mínimo de etanol deve ser de 94,5% v/v, e do bioetanol anidro combustível (BAC), cujo teor mínimo de etanol deve ser de 98% v/v. No Brasil, o bioetanol hidratado é utilizado diretamente como combustível; já o anidro é utilizado para adição na gasolina, em substituição a aditivos poluentes como chumbo tetraetila e Éter Metil-Terc-Butílico (MTBE).

No escopo internacional, no sentido de assegurar o controle da qualidade do bioetanol combustível, há importantes agências reguladoras responsáveis pela aplicabilidade das especificações técnicas e normas oficiais. Nos Estados Unidos e na União Europeia (UE), a qualidade é regulada respectivamente pelas normas da American Society for Testing and Materials (ASTM) e pelo European Committee for Standardization (ECS) por meio das normas europeias ou Europeans Norms (EN) (*White Paper...*, 2007).

No Brasil, tendo em vista a relevância de garantir a qualidade do bioetanol combustível e sua competitividade no mercado externo, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) destaca-se como órgão responsável pela regulação e fiscalização das atividades econômicas relacionadas à indústria dos combustíveis. Desta forma a ANP é res-

ponsável por colocar em prática a política nacional do bioetanol, garantindo o abastecimento do mercado e defendendo os interesses dos consumidores.

Neste cenário, a ANP estabelece por meio da Resolução ANP n.7 de 9 de fevereiro de 2011, as especificações do BAC e do BHC comercializados no país, segundo as disposições contidas no Regulamento Técnico ANP n.3/2011. A determinação das características físico-químicas deve ser realizada empregando-se as Normas Brasileiras (NBR) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) ou as normas da ASTM (ANP, 2011). A Tabela 26.1 mostra as especificações técnicas adotadas nos Estados Unidos, no Brasil e na União Europeia, que garantem a qualidade do bioetanol combustível.

Conforme pode ser observado, por meio da análise dos valores apresentados na Tabela 26.1, as especificações técnicas utilizadas nas três regiões são muito semelhantes; no entanto, a não conformidade, em alguns casos, pode significar sérias barreiras técnicas (Stradiotto et al., 2010) para a exportação do etanol brasileiro para o mercado consumidor mundial.

A semelhança nas especificações facilita o aperfeiçoamento dos métodos analíticos pelas três regiões produtoras contribuindo, assim, para a consolidação do bioetanol como um produto importante no mercado mundial, uma vez que o emprego do BAC, na forma de aditivo para a gasolina, melhora a combustão pelo aumento da octanagem e pela redução da liberação de monóxido de carbono.

Para facilitar o comércio internacional de bicomcombustíveis, foi elaborado, pelos órgãos regulamentadores brasileiros, coordenados pelo Ministério de Relações Exteriores em parceria com equipes da União Europeia e dos Estados Unidos, o documento *White Paper on Internationally Compatible Biofuel Standards* (2007), que classifica as especificações adotadas nestas regiões em três categorias (A, B e C) de acordo com a equivalência entre elas e estabelece metas para torná-las equivalentes.

Neste contexto, torna-se necessário um controle rígido dos parâmetros que afetam a qualidade desse produto, como acidez, pH, sódio e sulfato, dentre outros, pois eles podem intensificar a capacidade de corrosão do bioetanol, causando a aceleração do processo de deterioração dos componentes metálicos presentes nos motores. A presença de traços de cobre, ferro e cloreto pode comprometer a mistura combustível gasolina-bioetanol pela formação de gomas e produtos corrosivos, sendo então importante limitar

Tabela 26.1 – Especificações adotadas pelos Estados Unidos, Brasil e União Europeia para o controle da qualidade do bioetanol combustível

Parâmetro de qualidade	EUA		Brasil		UE
	ASTM D4806-10	ASTM D4806-10 Não desnaturado	ANP7/2011 (BAC)	ANP7/2011 BHC	
Aparência	Claro e brilhante	Claro e brilhante	Limpido e isento de impurezas	Limpido e isento de impurezas	Claro e brilhante
Cor	Corante permitido, mas não obrigatório	Corante permitido, obrigatório ou não	Laranja	Corante proibido no país	Corante permitido, mas não obrigatório
Densidade Máxima a 20°C, kg m <sup>-3</sup>	----	----	791,5	807,6	----
Condutividade Elétrica Máxima, µS m <sup>-1</sup>	----	----	350	350	----
Acidez Máxima, m/m %	0,007	0,0074	0,0038	0,0038	0,007
pHe	6,5-9,0	6,5-9,0	----	6,0 - 8,0	Dosado
Teor Mínimo de Etanol, vol, %	92,1	93,9	98,0	94,5	96,8
Teor Mínimo de etanol + alcoois saturados C3-C5, vol, %	----	98,4	----	----	98,8
Teor Mínimo Total de Etanol, vol, %	----	98,95	99,6	95,1 - 96	99,76
Teor Máximo de alcoois saturados C3-C5, vol, %	----	4,5	----	----	2,0
Teor Máximo de água, vol, %	1,0	1,05	0,4	4,9	0,24
Teor Máximo de Metanol, vol, %	0,5	0,53	1	1	1,0
Teor Mínimo/Máximo de desnaturante, vol, %	1,96/5,0	Não desnaturante	Não desnaturante	Não desnaturante	Estabelecido pelo país 0/1,3
Teor Máximo de Hidrocarbonetos, vol, %	----	----	3	3	----
Teor Máximo de Solvente-Goma lavada, mg/100 mL	5,0	5,3	----	----	----
Goma Máxima ou resíduo por evaporação, mg/100mL	5 (goma lavada)	5,3 (goma lavada)	5	5	10 (goma não lavada)
Teor Máximo de Sulfato, mg Kg <sup>-1</sup>	4	4,2	4	4	----
Teor Máximo de Cloreto, mg Kg <sup>-1</sup>	40	42,1	1	1	25
Teor Máximo de Sódio, mg Kg <sup>-1</sup>	----	----	2	2	----
Teor Máximo de Cobre, mg Kg <sup>-1</sup>	0,1	0,105	0,07	----	0,1
Teor Máximo de Ferro, mg Kg <sup>-1</sup>	----	----	5	5	----
Teor Máximo de Fósforo, mg L <sup>-1</sup>	----	----	----	----	0,5
Teor Máximo de Enxofre, mg Kg <sup>-1</sup>	30	5	----	----	10

a presença destes contaminantes a teores seguros. Já a presença de enxofre deve ser minuciosamente controlada pois, após a combustão, esse contaminante é convertido em  $\text{SO}_x$  sendo liberado para a atmosfera e tornando-se um grande problema ambiental.

Colaborando com este cenário, no Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia (Inmetro) tem papel fundamental por meio do desenvolvimento de material de referência certificado para bioetanol contribuindo para padronização deste biocombustível produzido no país. Com isso, é possível verificar o desempenho das técnicas analíticas e assim obter resultados comparáveis com confiabilidade conhecida tanto nacional quanto internacionalmente (Stradiotto et al., 2010). Assim, a possibilidade de ocorrência de barreiras técnicas à exportação decorrentes de não conformidades quanto a especificações requeridas nas diferentes regiões globais torna-se um fator superável.

Tendo em vista a relevância de garantir o cumprimento das especificações técnicas exigidas no controle de qualidade do bioetanol combustível, faz-se necessário o estabelecimento de métodos de análise oficiais por meio de normas técnicas. Estas normas técnicas devem apresentar clareza, norteando todas as condições analíticas, como por exemplo, tipo de pré-tratamento da amostra, procedimentos de calibração e técnica analítica, entre outros, a fim de atender às especificações nacionais. No Brasil, o desenvolvimento destas normas é feito pela ABNT e passa por várias etapas que vão desde observação de uma demanda, passando pela elaboração do projeto da norma com a participação dos setores interessados, por uma consulta nacional, até a aprovação do projeto após a consulta nacional pela comissão de estudo autora do mesmo.

Com a adoção de normas técnicas, o controle da qualidade do bioetanol combustível é feito de maneira uniforme. Desta forma, a adoção de limites para a quantidade de contaminantes presentes no bioetanol combustível, os quais foram verificados com métodos analíticos com confiabilidade estabelecida (utilizado método oficial por meio de norma técnica), contribui para a padronização deste produto. Na Tabela 26.2 estão listadas as principais técnicas analíticas recomendadas nos métodos oficiais utilizados para regular o teor de contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes em bioetanol combustível no Brasil, Estados Unidos e União Europeia.

Tabela 26.2 – Técnicas empregadas nos métodos oficiais para a quantificação de contaminantes orgânicos e inorgânicos adotados no Brasil, Estados Unidos e União Europeia, presentes em bioetanol combustível (*White Paper...*, 2007; Oliveira et al., 2009)

<b>Espécie contaminante</b>	<b>Técnica recomendada</b>	<b>Norma Técnica</b>
Cloreto	Cromatografia Iônica	ASTM D7319-09 NBR 10894 EN 15492-08
Sulfato	Cromatografia Iônica	ASTM D7319-09 NBR 10894 EN 15492-08
Sódio	Fotometria de Chama	NBR 10422 EU e EUA: sem especificação
Cobre	Espectroscopia de Absorção Atômica	ASTM D1688-07 NBR 11331 EN 15488-07
Ferro	Espectroscopia de Absorção Atômica	NBR 11331 EU e EUA: sem especificação
Enxofre	Espectrometria de Fluorescência de Raios-X (EUA)	ASTM D2622-10
	Fluorescência Ultravioleta (EUA)	ASTM D5453-09
	Espectrometria de Fluorescência de Raios-X (UE)	EN 15485-07
	Fluorescência Ultravioleta (UE)	EN 15485-07
		Brasil: sem especificação
Fósforo	Espectrofotometria (UE)	EN 15487-07 Brasil e EUA: sem especificação
Metanol	Cromatografia Gasosa (UE e EUA)	ASTM D5501-09 EN 13132-00 Brasil: sem especificação
Álcool C3-C5	Cromatografia Gasosa (UE)	EN 13132-00 Brasil e EUA: sem especificação

A análise das técnicas apresentadas na Tabela 26.2 mostra uma variedade de técnicas instrumentais modernas caracterizadas por alta seletividade, sensibilidade e frequência analítica. Por exemplo, para a determinação de sulfato e cloreto, para a qual inicialmente se empregava o método volumétrico, atualmente se baseia a análise na cromatográfica iônica, técnica adotada nas três importantes regiões produtoras/consumidoras de bioetanol combustível (Brasil, União Europeia e Estados Unidos) como método oficial.

Embora já existam métodos modernos e desenvolvidos para determinação de vários contaminantes, não há especificações técnicas oficiais para a determinação de algumas destas espécies, por exemplo, o acetaldeído e

os aldeídos superiores presentes no bioetanol, fato que tem despertado o interesse de diversos pesquisadores em desenvolver métodos analíticos altamente precisos e de baixo custo para a quantificação dessas diversas espécies químicas nesta matriz. Entre os métodos desenvolvidos, destaca-se a utilização de técnicas cromatográficas para a quantificação de contaminantes orgânicos, enquanto para as espécies inorgânicas catiônicas destacam-se o uso da espectrometria atômica e técnicas eletroanalíticas, e para a determinação de espécies aniônicas destaca-se o emprego da eletroforese capilar (Stradiotto et al., 2010; Oliveira et al., 2009).

Apesar de a ANP adotar métodos oficiais por meio de normas técnicas para o controle da qualidade do bioetanol, novos métodos analíticos cada vez mais sensíveis têm sido desenvolvidos para análise de seus contaminantes e também para acompanhar a possível modificação química e/ou física desse biocombustível após o processo de produção. Embora estes contaminantes representem um papel quantitativamente secundário no etanol produzido, o conhecimento e o controle dessas impurezas assumem papel fundamental nas diversas etapas de seu emprego, como: (i) evitar “envenenamento” de catalisadores automotivos, cada vez mais sofisticados e caros, (ii) minimizar reações químicas secundárias em motores do tipo *flex-fuel* desenvolvidos com alta tecnologia, cuja emissão de poluentes acarreta prejuízos ao meio ambiente e (iii) evitar outros danos ao motor e às peças adjacentes no que se refere aos processos de corrosão ou lixiviamento, acarretados por teores de contaminantes acima do valor permitido.

Portanto, é facilmente perceptível a importância da pesquisa no contexto do desenvolvimento de metodologias alternativas associadas aos métodos oficiais, regulados por vários órgãos governamentais responsáveis pela fiscalização da qualidade de bioetanol. Esse biocombustível será um produto-chave global na substituição dos combustíveis fósseis, no mercado consumidor mundial, em um futuro muito próximo, devido aos benefícios socioeconômicos e ambientais.

## **Análise de espécies catiônicas em bioetanol combustível**

Além do número significativo de substâncias orgânicas presentes no bioetanol combustível, oriundas do processo de produção ou de conta-



minação na estocagem ou no transporte aos postos, é fundamental ter em mente que componentes inorgânicos também estão presentes nessa matriz, como por exemplo, ânions e cátions metálicos. Portanto, quantificação destas espécies torna-se necessária, pois existem problemas relacionados com a sua emissão para o ambiente, bem como o fenômeno de corrosão acentuada nos motores e contaminação de estágios em plantas industriais onde o bioetanol é utilizado como matéria-prima (Oliveira et al., 2009).

Quanto à análise de espécies catiônicas no bioetanol, deve-se salientar que a legislação atual (ABNT, ASTM ou ECS) ainda não apresenta normas oficiais para controle de qualidade de espécies como o chumbo e o níquel, entre outros. O primeiro trabalho sobre a determinação de espécies catiônicas presentes neste biocombustível foi realizado por Bruning e Malm em 1982, sendo realizadas análises de Fe, Ni, Cu, K, Na e Cr por espectrometria de absorção atômica.

Após 1998, houve um salto considerável no número de trabalhos científicos sobre a análise de espécies catiônicas empregando diferentes técnicas instrumentais como espectrometria de emissão atômica Faes (do inglês *flame atomic emission spectroscopy*) (Oliveira, A. P. et al., 2002a), espectrometria de absorção atômica Faas (*flame atomic absorption spectroscopy*) (Padilha; Padilha; Rocha, 1999; Gomes et al., 1998; Roldan et al., 2003; Silva; Budziak; Carasek, 2004; Teixeira et al., 2005; Moreira; Gushikem, 1985; Filho et al., 1995; Oliveira, M. F. et al., 2008), espectrometria de absorção atômica em forno de grafite GF-AAS (*graphite furnace atomic absorption spectrometry*) (A. P. Oliveira et al., 2002b; A. P. Oliveira et al., 2002c; Saint'pierre, 2008; Amorim et al., 2008) e eletrotérmica (ET-AAS) (Giacomelli et al., 2004), espectrofotometria no UV-Vis (UV-Vis) (Teixeira et al., 2006), espectroscopia de massas com plasma indutivamente acoplado ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) (Saint'Pierre et al., 2006, 2006b; Tormen et al., 2008; Rocha et al., 2011), cromatografia (Dias et al., 2010), técnicas eletroanalíticas (M. F. Oliveira et al., 2002, 2004; Takeuchi et al., 2007a, 2007b; Neves et al., 1987; Mattos et al., 2008; Takeuchi et al., 2009; Munoz; Angnes, 2004; Tartarotti et al., 2006; Bergamini; Santos; Stradiotto, 2006; Cesarino; Marino; Cavalheiro, 2010) e eletroforese capilar (Munoz et al., 2004).

Os trabalhos citados utilizaram técnicas que permitiram o desenvolvimento de métodos com limites de detecção indo de 35 a  $1,0 \times 10^{-6}$  mg L<sup>-1</sup>, fato que evidencia a possibilidade de atender à necessidade de pôr em práti-

ca uma legislação mais exigente. Estes trabalhos englobam a análise de uma grande variedade de espécies, e ainda não há regulamentação para todas elas. Desta forma, fica evidente a importância da antecipação do desenvolvimento de métodos que contemplem possíveis demandas analíticas. A seguir são descritos sumariamente os trabalhos publicados na literatura sobre os novos métodos analíticos para a aferição da qualidade do bioetanol combustível.

A. P. Oliveira et al. (2002a) determinaram Na em bioetanol utilizando a técnica de Faes com calibração por adição de padrão com o uso de potássio como supressor ionização. Com isso, foi alcançado um limite de detecção de  $2,6 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Padilha, Padilha e Rocha (1999) descrevem o desenvolvimento de um método de determinação de íons metálicos em bioetanol em nível de traços por meio da Faas com pré-concentração com ácido carboximetilcelulose (CMCH). Desta forma Cd, Cu, Cr, Fe, Ni e Zn, foram determinados utilizando sistema em fluxo e eluição feita com solução de ácido clorídrico  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ . Um fator de enriquecimento de vinte vezes foi obtido com o procedimento de pré-concentração.

Gomes et al. (1998) propuseram a utilização de uma coluna empacotada com sílica gel modificada com grupos 5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-tiol para a determinação de metais como Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn em bioetanol combustível. Além de a coluna apresentar estabilidade química e rápida adsorção dos metais, o método proposto mostrou-se confiável em estudos de recuperação.

Roldan et al. (2003) aplicaram a técnica de Faas para a determinação de várias espécies metálicas como Cu, Ni e Zn, após pré-concentração em coluna empacotada com sílica gel modificada com 2-aminotiazol. Os resultados obtidos em análises de amostras de bioetanol com o método proposto foram compatíveis com os obtidos por FG-AAS. Os limites de detecção alcançados em  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram 1,7 (Cu), 2,3 (Ni), 0,34 (Zn).

Silva et al. (2004) utilizaram um sistema de pré-concentração *on-line* com microcoluna de sílica gel modificada com óxido de molibdênio V ( $\text{Nb}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ ) para determinação de Cu, Cd, Co, e Zn em bioetanol utilizando Faas. Nesse trabalho foi alcançado um limite de detecção de em  $\mu\text{g L}^{-1}$  de 1,4 (Cu), 0,2 (Cd), 1,4 (Co) e 1,0 (Zn).

Teixeira et al. (2005) utilizaram uma resina polimérica, Amberline XAD-4 funcionalizada com 3,4-ácido dihidroxibenzoico, para pré-concen-

tração *on-line* de Cu, Fe, Ni e Zn em bioetanol. Nesse trabalho os autores alcançam limite de detecção em  $\mu\text{g L}^{-1}$  de 2,3 (Cu), 5,0 (Fe), 7,8 (Ni) e 0,1 (Zn) utilizando a técnica Faas.

Moreira e Gushikem (1985) utilizam uma coluna de sílica gel funcionalizada com grupos 3(1-imidazol)propil para pré-concentrar Cu, Ni, Fe, Zn e Cd presente em etanol e posterior determinação destes metais por Faas.

Filho et al. (1995) propuseram o uso de sílica gel modificada quimicamente com moléculas benzamidazólicas para pré-concentrar Mn, Ni, Cu, Zn, Cd e Fe em bioetanol e posterior determinação por Faas. A eluição foi feita com ácido clorídrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em uma mistura água/etanol com fração molar da água de 0,8.

M. F. Oliveira et al. (2008) desenvolveram uma metodologia para a determinação de Fe, Cu, Ni e Zn em bioetanol por Faas, na qual a solução dos íons metálicos foi pré-concentrada por pirólise. A determinação dos metais foi feita por curva analítica com intervalo de trabalho de  $100\text{-}1000 \mu\text{g kg}^{-1}$  e os valores de recuperação encontrados ficaram entre 97 e 102%.

A. P. Oliveira et al. (2002b) utilizaram a GF-AAS com aquecimento transversal e adição de modificador químico,  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , e fizeram a determinação simultânea de Al, As, Cu, Fe, Mn e Ni. A metodologia empregada permitiu a obtenção de limites de detecção em  $\mu\text{g L}^{-1}$  de 1,2 (Al) 2,5 (As), 0,22 (Cu), 1,6 (Fe), 0,20 (Mn) e 1,1 (Ni).

A. P. Oliveira et al. (2002c) desenvolveram um método utilizando GF-AAS com plataforma de grafite tratada com tungstênio e ródio e adição de modificadores químicos para a determinação simultânea de Al, As, Cu, Fe, Mn. Os limites de detecção alcançados nesse trabalho em  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram de 1,9 (Al), 2,9 (As), 0,57 (Cu), 1,3 (Fe), 0,40 (Mn) e 1,3 (Ni).

Saint'Pierre et al. (2008) quantificaram Cd e Pb em bioetanol por meio da espectrometria de absorção atômica de forno com filtro de grafite. O forno com filtro de grafite foi utilizado para eliminar a necessidade de modificação química para estabilizar analitos voláteis, além de poder ser aplicado na pirólise. Os testes de recuperação foram feitos em sete amostras de bioetanol comercial e obtiveram valores entre 90 e 120%. Os limites de detecção em  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram 0,1 para Cd e 0,3 para Pb.

Amorim et al. (2008) determinaram Ba, Cr, e Mo (grupo 1) e Cu, Fe, Ni e Pb (grupo 2) em amostras de bioetanol. Nesse trabalho foi utilizada a técnica FG-AAS com tungstênio como modificador permanente juntamente com  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  para o grupo 2 e sem a adição de modificadores

para o grupo 1. Os limites de detecção alcançados nesse trabalho em  $\mu\text{g L}^{-1}$  foi de 0,6 (Ba), 0,1 (Cr), 0,6 (Cu), 1,8 (Fe), 0,2 (Mo), 0,4 (Ni) e 0,6 (Pb).

Giacomelli et al. (2004) utilizaram irídio e ródio como modificadores permanentes para determinação de As, Cd e Pb em bioetanol e metanol utilizando GF-AAS. O desempenho do modificador permanente proposto, quando comparado aos modificadores paládio e magnésio, forneceu melhor recuperação e baixos níveis de *background*.

Teixeira et al. (2006) realizaram a determinação de Cu e Fe utilizando ligantes da classe ferroína devido à formação de complexos estáveis entre os ligantes e as espécies metálicas iônicas. Outros íons metálicos também formam complexos com esta classe de ligantes, mas as características espectrais são diferentes o suficiente para evitar a interferência com a análise espectrofotométrica de Cu e Fe. Nesse trabalho os autores conseguiram limites de detecção, respectivamente para Fe e Cu, de 7 e 8  $\mu\text{g L}^{-1}$  utilizando a 1,10-fenantroína e de 11 e 32  $\mu\text{g L}^{-1}$  utilizando a 2,2'-bipiridina como ligante.

Saint'Pierre et al. (2006a) aplicaram a técnica de ICP-MS na análise de um amplo espectro de espécies catiônicas em bioetanol. Nesse trabalho, foi possível obter limites de detecção em  $\mu\text{g L}^{-1}$  de 0,08 (Ag), 0,12 (Cd), 0,04 (Co), 0,4 (Cu), 27 (Fe), 0,7 (Mn), e 0,4 (Ni) pelo método de diluição de isótopos.

Saint'Pierre et al. (2006b) descreveram um método para determinação de Ag, Cd, Cu, Pb e Tl em bioetanol por meio da técnica ICP-MS com vaporização eletrotérmica e diluição de isótopo. Amostras de bioetanol do tipo comum, aditivado e anidro foram analisadas e os isótopos de referência foram  $^{109}\text{Ag}$  e  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{112}\text{Cd}$  e  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{63}\text{Cu}$  e  $^{65}\text{Cu}$ ,  $^{206}\text{Pb}$  e  $^{208}\text{Pb}$  e  $^{203}\text{Tl}$  e  $^{205}\text{Tl}$ . Os limites de detecção alcançados em  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram de 0,02 (Ag), 0,08 (Cd), 0,1 (Cu), 0,05 (Pb) e 0,001 (Tl). A diluição de isótopo mostrou ser um método de calibração robusto, rápido e simples para análise de bioetanol.

Tormen et al. (2008) determinaram Cu, Cd, Ni, Pb, Tl e Sn em bioetanol utilizando um micronebulizador concêntrico para introdução da amostra no plasma em ICP-MS. O limite de detecção alcançado nesse trabalho em  $\mu\text{g L}^{-1}$  foi de 0,1 (Cd), 0,02 (Cu), 0,07 (Ni), 0,02 (Pb), 0,1 (Sn) e 0,03 (Tl).

Rocha et al. (2011) determinaram ferro e cobre em etanol utilizando espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) utilizando um nebulizador ultrassônico acoplado a uma membrana para dessolvatação sem tratamento adicional na amostra. Nesse trabalho o limite de detecção alcançado foi de 0,1 e 0,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para Cu e Fe respectivamente.

Dias et al. (2010) desenvolveram um método para determinação de metais em etanol baseado na cromatografia iônica com reação pós-coluna com 4-(2-piridilazo)resorcinol e detecção espectrofotométrica. O método mostrou-se livre de interferentes e apresentou limites de quantificação em  $\mu\text{g L}^{-1}$  de 6,8 (Zn), 29,6 (Fe) e 24,8 (Cu).

Quanto a metodologias baseadas em técnicas eletroanalíticas, que geralmente são de baixo custo operacional e são compatíveis com as técnicas convencionais em termos de robustez e precisão, são encontrados alguns trabalhos sobre a determinação de espécies catiônicas em bioetanol.

Oliveira et al. (2004) determinaram Zn, Cu, Pb e Cd simultaneamente em bioetanol dissolvido em água utilizando a técnica voltametria de redissolução anódica com tempo de pré-concentração de 10 min com eletrodo de filme de mercúrio suportado em carbono vítreo. As modalidades de varredura linear e pulso diferencial foram testadas, encontrando valores de limites de detecção de  $10^{-9}$  a  $10^{-8}$  mol  $\text{L}^{-1}$  sem pré-tratamento das amostras. Este trabalho apresentou detectibilidade de 10-100 vezes menor que a espectroscopia de absorção atômica com chama.

Takeuchi et al. (2007a) utilizaram sílica organofuncionalizada com 2-aminotiazol (SiAt-SPCPE) como modificador químico na pasta de carbono para a detecção de Cu em amostras de bioetanol sem nenhum tratamento da amostra. A técnica voltametria de redissolução anódica na modalidade pulso diferencial foi utilizada nas medidas com 20 min de pré-concentração. Foi possível obter uma faixa de trabalho linear de  $7,5 \times 10^{-8}$  a  $2,5 \times 10^{-6}$  mol  $\text{L}^{-1}$  com limite de detecção de  $3,1 \times 10^{-8}$  mol  $\text{L}^{-1}$ .

Neves et al. (1987) descreveram a utilização da tioureia como agente precipitante para o eletrodo de membrana de cobre. O eletrodo construído foi aplicado na técnica de titulação potenciométrica e, assim, foi possível realizar a determinação direta de Cu em bioetanol comercial.

Mattos et al. (2008) desenvolveram um método utilizando voltametria adsortiva com onda quadrada e eletrodo de pasta de carbono modificada com 1,10-fenantrolina/nafion para determinação de Fe em bioetanol. O limite de detecção alcançado foi de  $2,4 \times 10^{-6}$  mol  $\text{L}^{-1}$  com tempo de pré-concentração de 5 min. As análises realizadas em amostras de bioetanol tiveram resultado semelhantes aos obtidos por Faas.

Takeuchi et al. (2009) determinaram Cu em etanol utilizando microeletrodos de ouro e a técnica voltametria de redissolução anódica na modalidade

de varredura linear. Com o método empregado foi alcançado um limite de detecção de  $22 \text{ nmol L}^{-1}$  e um intervalo linear de  $0,05$  a  $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados obtidos em análises de amostras de etanol foram concordantes com os obtidos por Faas.

Oliveira et al. (2002) determinaram Zn em bioetanol utilizando eletrodo de filme de mercúrio suportado em carbono vítreo. A técnica utilizada foi voltametria de redissolução anódica na modalidade de varredura linear. Nesse trabalho foi alcançado o limite de detecção de  $2,6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e faixa linear de  $5,0 \times 10^{-7}$  a  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

Munoz e Angnes (2004) desenvolveram um método para a determinação de Cu e Pb em bioetanol por voltametria de redissolução anódica na modalidade de onda quadrada utilizando eletrodo de ouro. A determinação foi feita de duas maneiras diferentes: a primeira foi por determinação direta utilizando mistura etanol/água e tempo de deposição de 15 min e a segunda foi por evaporação do solvente e posterior dissolução em solução de eletrólito suporte. Os dois métodos mostraram resultados compatíveis. O limite de detecção alcançado utilizando etapa de deposição foi de 120 e 235  $\text{ng L}^{-1}$  respectivamente para Cu e Pb com variação no estudo de recuperação no intervalo de 102 a 114%.

Tartarotti et al. (2006) determinaram Ni em bioetanol utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com dimetilglioxima. Nesse trabalho foi empregada a técnica voltametria de pulso diferencial com tempo de pré-concentração de 25 min. O intervalo de trabalho da curva analítica utilizada foi de  $5,0 \times 10^{-9}$  –  $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  e o limite de detecção alcançado foi de  $2,7 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ . A regeneração do eletrodo foi feita por imersão em solução de HCl  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  por 5 min. O limite de detecção obtido com o método proposto foi dez vezes menor que o obtido com GF-AAS.

Bergamini, Santos e Stradiotto (2006) determinaram Pb em bioetanol utilizando eletrodo de pasta de carbono modificada com resina de troca iônica Amberlite IR 120. A técnica empregada foi a voltametria de redissolução anódica com tempo de pré-concentração de 15 min. A aplicação do método possibilitou a obtenção de uma faixa linear de  $9,9 \times 10^{-9}$ – $1,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e um limite de detecção de  $7,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  com resultados de estudos de recuperação entre 98-102%.

Takeuchi et al. (2007b) determinaram Ni em bioetanol utilizando um eletrodo de pasta de carbono com parafina sólida como aglutinante, a qual foi

quimicamente modificada com sílica organofuncionalizada com 2-aminotiazol. Os passos envolvidos no método utilizado foram: pré-concentração por 20 min dos íons  $\text{Ni}^{2+}$  presentes no etanol e posteriormente foi feita a transferência do eletrodo para uma célula eletroquímica contendo dimetilglioxima (DMG) para formar o complexo  $[\text{Ni}(\text{DMG})_2]^{2+}$ . Em seguida foi utilizada a voltametria de pulso diferencial para reduzir o complexo presente na superfície do eletrodo e registrar o sinal; depois disso a superfície do eletrodo foi regenerada por polimento. Nesse trabalho, os autores alcançaram faixa linear de  $7,5 \times 10^{-9} - 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  e limite de detecção de  $2,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ .

Cesarino, Marino e Cavalheiro (2010) determinaram Cu em bioetanol utilizando um eletrodo sólido de grafite-poliuretano modificado com sílica organofuncionalizada com 2-benzotiazol. Nesse trabalho os autores utilizaram a voltametria de redissolução anódica no módulo pulso diferencial com tempo de pré-concentração de 20 min em amostras água/etanol. Desta forma os autores alcançaram uma faixa de resposta linear de 0,1-1,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e um limite de detecção de  $3,9 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . Os resultados obtidos em estudos de recuperação ficaram entre 90,3-107,3% e os resultados obtidos em análises de etanol de postos de combustíveis foram compatíveis com os obtidos por Faas.

Munoz et al. (2004) determinaram Na, K, Ca, Mg e  $\text{NH}_4^+$  em bioetanol por eletroforese capilar utilizando detecção eletroquímica sem contato. Este tipo de detecção baseia-se na medida de condutividade sem contato com a solução, o qual é vantajoso por evitar a adsorção de componentes da matriz na superfície da célula condutométrica, o que conduziria à perda de repetibilidade nas medidas. A detecção eletroquímica sem contato tem sido amplamente empregada em eletroforese capilar e cromatografia iônica. Informações adicionais sobre medidas de condutividade sem contato como forma de detecção em eletroforese capilar podem ser encontradas na literatura (Silva; Lago, 1998; Zemmann et al., 1998). O método desenvolvido utilizou calibração com adição de lítio como padrão interno. O pré-tratamento da amostra utilizado no método foi a completa evaporação do etanol seguida pela redissolução do resíduo obtido em água deionizada. Os limites de detecção alcançados nesse trabalho em  $\text{mg L}^{-1}$  foram de 0,12, 0,18, 0,13 e 0,14 respectivamente para  $\text{NH}_4^+$ , K, Na, Ca e Mg.

Uma visão comparativa acerca dos trabalhos relatados na literatura até a presente data, pertinentes à análise de espécies catiônicas em bioetanol por diferentes técnicas instrumentais, pode ser obtida na Tabela 26.3.

Tabela 26.3 – Metodologias analíticas utilizadas para a análise de espécies catiônicas em bioetanol

Espécie	Técnica	Limite de detecção	Referência
Alumínio	GF AAS	1,2 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira, 2002b
	GF AAS	1,9 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira, 2002c
Amônio	CE	0,12 mg L <sup>-1</sup>	Munoz et al., 2004
Antimônio	ICP-MS	0,02 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
Arsênio	GF AAS	2,5 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira, 2002b
	GF AAS	2,9 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira, 2002c
	ET AAS	2,0 µg L <sup>-1</sup>	Giacomelli et al., 2004
	ICP-MS	0,01-0,03 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
Bário	GF AAS	0,6 µg L <sup>-1</sup>	Amorim et al., 2008
Bismuto	ICP-MS	0,02 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
Cádmio	Faas	--	Padilha; Padilha; Rocha, 1999
	Faas	N/E	Gomes et al., 1998
	Faas	0,02 µg L <sup>-1</sup>	Silva; Budziak; Carasek, 2004
	ET AAS	0,05 µg L <sup>-1</sup>	Giacomelli et al., 2004
	ETV ICP-MS	0,08 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre; Frescura; Curtius, 2006b
	ICP-MS	0,12 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre et al., 2006a
	DP ASV	2,21 µg L <sup>-1</sup>	M. F. Oliveira et al., 2004
	GF AAS	0,1 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre et al., 2008
Cálcio	ICP-MS	0,1 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
	CE	0,14 mg L <sup>-1</sup>	Munoz et al., 2004
Chumbo	Faas	N/E	Gomes et al., 1998
	ET AAS	1,1 µg L <sup>-1</sup>	Giacomelli et al., 2004
	ETV ICP-MS	0,05 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre; Frescura; Curtius, 2006b
	ICP-MS	0,2 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre et al., 2006a
	DP ASV	3,0 µg L <sup>-1</sup>	M. F. Oliveira et al., 2004
	SW ASV	235 ng L <sup>-1</sup>	Munoz; Angnes, 2004
	DP ASV	2,0 µg L <sup>-1</sup>	Takeuchi et al., 2007a
	GF AAS	0,3 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre et al., 2008
	GF AAS	0,6 µg L <sup>-1</sup>	Amorim et al., 2008
	ICP-MS	0,02 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
Cobalto	Faas	N/E	Gomes et al., 1998
	Faas	1,4 µg L <sup>-1</sup>	Silva; Budziak; Carasek, 2004
	ICP-MS	0,04 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre et al., 2006a
	ICP-MS	0,03 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008

Continua



Tabela 26.3 – *Continuação*

Espécie	Técnica	Limite de detecção	Referência
Cobre	Faas	N/E	Bruning; Malm, 1982
	Faas	--	Padilha; Padilha; Rocha, 1999
	Faas	N/E	Gomes et al., 1998
	Faas	1,7 µg L <sup>-1</sup>	Roldan et al., 2003
	Faas	1,4 µg L <sup>-1</sup>	Silva; Budziak; Carasek, 2004
	Faas	2,3 µg L <sup>-1</sup>	Roldan et al., 2003
	Faas	N/E	Moreira; Gushikem, 1985
	Faas	N/E	Filho et al., 1995
	Faas	0,5 µg L <sup>-1</sup>	Garcia; Gaubeur, 2011
	GF AAS	0,22 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira, 2002b
	GF AAS	0,57 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira, 2002c
	HPLC	7,4 µg L <sup>-1</sup>	Dias et al., 2010
	ICP-MS	0,4 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre et al., 2006a
	ICP-OES	0,078 µg L <sup>-1</sup>	Rocha et al., 2011
	ETV ICP-MS	0,1 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre; Frescura; Curtius, 2006b
	DP ASV	1,01 µg L <sup>-1</sup>	M. F. Oliveira et al., 2004
	UV/Vis	8 µg L <sup>-1</sup>	Teixeira et al., 2006
	SW ASV	0,120 µg L <sup>-1</sup>	Munoz; Angnes, 2004
	Potenciometria	N/E	Neves; Neto; Serrano, 1987
	LS-ASV	1,4 µg L <sup>-1</sup>	Takeuchiet al., 2009
GF AAS	0,6 µg L <sup>-1</sup>	Amorim et al., 2008	
ICP-MS	0,09–0,2 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008	
Faas	6,24 µg L <sup>-1</sup>	M. F. Oliveira et al., 200	
DP-ASV	2,5 µg L <sup>-1</sup>	Cesarino; Marino; Cavalheiro, 2010	
Cromo	Faas	N/E	Bruning; Malm, 1982
	Faas	--	Padilha; Padilha; Rocha, 1999
	GF AAS	0,1 µg L <sup>-1</sup>	Amorim et al., 2008
Estanho	ICP-MS	0,1 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
Estrôncio	ICP-MS	0.01–0.03 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
Ferro	Faas	N/E	Bruning; Malm, 1982
	Faas	--	Padilha; Padilha; Rocha, 1999
	Faas	N/E	Gomes et al., 1998
	Faas	5,0 µg L <sup>-1</sup>	Roldan et al., 2003
	Faas	N/E	Moreira; Gushikem, 1985
	Faas	N/E	Filho et al., 1995

*Continua*

Tabela 26.3 – *Continuação*

Espécie	Técnica	Limite de detecção	Referência
Ferro	GF AAS	1,6 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira, 2002b
	GF AAS	1,3 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira, 2002c
	HPLC	8,9 µg L <sup>-1</sup>	Dias et al., 2010
	ICP-MS	27 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre et al., 2006a
	ICP-OES	0,16 µg L <sup>-1</sup>	Rocha et al., 2011
	UV/Vis	7 µg L <sup>-1</sup>	Teixeira et al., 2006
	AdV	133 µg L <sup>-1</sup>	Mattos et al., 2008
	GF AAS	1,8 µg L <sup>-1</sup>	Amorim et al., 2008
	ICP-MS	0,7-4 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
	Faas	2,13 µg L <sup>-1</sup>	M. F. Oliveira et al., 2008
Gálio	ICP-MS	0,06-0,2 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
Magnésio	CE	0,14 mg L <sup>-1</sup>	Munoz et al., 2004
Manganês	GF AAS	0,20 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira, 2002b
	GF AAS	0,40 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira, 2002c
	Faas	N/E	Filho et al., 1995
	ICP-MS	0,7 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre et al., 2006a
	ICP-MS	0,02-0,4 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
Molibdênio	GF AAS	0,2 µg L <sup>-1</sup>	Amorim et al., 2008
Níquel	ICP-MS	0,1-0,5 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
	Faas	N/E	Bruning; Malm, 1982
	Faas	--	Padilha; Padilha; Rocha, 1999
	Faas	N/E	Gomes et al., 1998
	Faas	2,3 µg L <sup>-1</sup>	Roldan et al., 2003
	Faas	7,8 µg L <sup>-1</sup>	Roldan et al., 2003
	Faas	N/E	Moreira; Gushikem, 1985
	Faas	N/E	Filho et al., 1995
	GF AAS	1,1 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira, 2002b
	GF AAS	1,3 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira, 2002c
	ICP-MS	0,4 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre et al., 2006a
	DPV	58 ng L <sup>-1</sup>	Tartarotti et al., 2006
	DPV	1,5 µg L <sup>-1</sup>	Bergamini; Santos; Stradiotto et al., 2006
	AdV	0,12 µg L <sup>-1</sup>	Takeuchi et al., 2007b
	GF AAS	0,4 µg L <sup>-1</sup>	Amorim et al., 2008
	Faas	18,3 µg L <sup>-1</sup>	M. F. Oliveira et al., 2008
	Potássio	Faas	N/E
CE		0,18 mg L <sup>-1</sup>	Munoz et al., 2004

*Continua*

Tabela 26.3 – *Continuação*

Espécie	Técnica	Limite de detecção	Referência
Prata	ICP-MS	0,08 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre et al., 2006a
	ETV ICP-MS	0,02 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre; Frescura; Curtius, 2006b
Rubídio	ICP-MS	0,03 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
Selênio	ICP-MS	0,4-0,6 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
Sódio	Faas	N/E	Bruning; Malm, 1982
	Faes	2,6 µg L <sup>-1</sup>	A. P. Oliveira et al., 2002a
	CE	0,13 mg L <sup>-1</sup>	Munoz et al., 2004
Tálio	ETV ICP-MS	0,001 µg L <sup>-1</sup>	Saint'pierre; Frescura; Curtius, 2006b
	ICP-MS	0,03 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
Vanádio	ICP-MS	0,06-0,5 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
Zinco	Faas	--	Padilha; Padilha; Rocha, 1999
	Faas	N/E	Gomes et al., 1998
	Faas	0,34 µg L <sup>-1</sup>	Roldan et al., 2003
	Faas	1,0 µg L <sup>-1</sup>	Silva; Budziak; Carasek, 2004
	Faas	0,1 µg L <sup>-1</sup>	Roldan et al., 2003
	Faas	N/E	Moreira; Gushikem, 1985
	Faas	N/E	Filho et al., 1995
	DP ASV	17 µg L <sup>-1</sup>	M. F. Oliveira et al., 2002
	DP ASV	1,23 µg L <sup>-1</sup>	M. F. Oliveira et al., 2004
	ICP-MS	0,4-0,6 µg L <sup>-1</sup>	Tormen et al., 2008
	Faas	29,8 µg L <sup>-1</sup>	M. F. Oliveira et al., 2008
	HPLC	2,0 µg L <sup>-1</sup>	Dias et al., 2010

N/E = não especificado; GF-AAS = espectrometria de absorção atômica por forno de grafite; CE = eletroforese capilar; ICP-MS = espectroscopia de massas com plasma indutivamente acoplado; ET-AAS = espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica; Faas = espectrometria de absorção atômica com chama; ETV = vaporização eletrotérmica; AdV = voltametria adsorviva; DP ASV = voltametria de redissolução com pulso diferencial; SW ASV = voltametria de redissolução com onda quadrada; HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência; ICP-OES = espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado; UV/Vis = espectrofotometria molecular no ultravioleta e visível.

Com base no número expressivo de estudos publicados na literatura, relacionados à análise de espécies catiônicas em bioetanol, pode-se concluir que o panorama científico acerca das opções de metodologias de análise encontra-se substancialmente bem embasado. Este cenário, entretanto, não deve ser visto como estado de excelência na análise de cátions em bioetanol, pois se deve salientar sempre a possibilidade de otimizações nas metodologias atuais, bem como a criação de novos métodos para esta importante classe de constituintes da matriz energética para que se possa atender a demandas cada vez mais exigentes.

## Análise de espécies aniônicas inorgânicas em bioetanol combustível

Existe um número relativamente pequeno de trabalhos descrevendo métodos analíticos para a quantificação de contaminantes inorgânicos aniônicos em bioetanol. A maioria desses métodos foi desenvolvida para a determinação de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ , os únicos ânions inorgânicos cujos teores são regulamentados pela ANP. Na Tabela 26.4 estão sumarizados os principais métodos analíticos desenvolvidos para a quantificação de ânions inorgânicos em bioetanol.

Tabela 26.4 – Métodos analíticos desenvolvidos para a quantificação de ânions inorgânicos em bioetanol

Analito	Técnica	Limite de Detecção / $\text{mg L}^{-1}$	Referência
Cloreto	Potenciometria	N/E	Bruning; Malm, 1982
	UV-CE	0,026	Pereira et al., 2004
	UV-CE	0,012	Pereira et al., 2006
	CCD-CE	0,06	Munoz et al., 2004
	IC	N/E	Herrmann; Chassinol; Thomas, 2007
	CT	0,88	Avelar; Barbeira, 2007
	ASV	0,13	Ferreira; Lima; Barbeira, 2008
	AD-FIA	0,13	Paula et al., 2008
	EDXRF	0,025	Teixeira et al., 2009
Sulfeto	Potenciometria	N/E	Bruning; Malm, 1982
Sulfato	Gravimetria	N/E	Bruning; Malm, 1982
	UV-CE	0,032	Pereira et al., 2004
	UV-CE	0,021	Pereira et al., 2004
	CCD-CE	0,08	Munoz et al., 2004
	IC	N/E	Herrmann; Chassinol; Thomas, 2007
	EDXRF	0,030	Paula et al., 2008
	UV-SIA	0,27	Oliveira; Korn, 2006
Nitrato	CCD-CE	0,08	Munoz et al., 2004

UV-CE = eletroforese capilar com detecção no ultravioleta; CCD-CE = eletroforese capilar com detecção condutimétrica sem contato; IC = cromatografia iônica, CT = titulação condutimétrica, ASV = voltametria de redissolução anódica, AD-FIA = Análise em fluxo com detecção amperométrica, EDXRF = fluorescência de raios X por dispersão de energia, UV-SIA = análise por injeção sequencial com detecção no ultravioleta.

Conforme pode ser observado na Tabela 26.4, a técnica de eletroforese capilar é a mais comumente empregada para a quantificação de ânions inorgânicos em bioetanol. Nessa técnica, um fluxo eletrosmótico é criado pela aplicação de uma elevada diferença de potencial (10-40 kV) ao longo de um capilar de sílica fundida preenchido com uma solução tampão que atua como eletrólito. Em valores de pH superiores a 3, os grupos silanóis das paredes do capilar encontram-se ionizados; forma-se, então, uma dupla camada elétrica constituída pela parede do capilar carregada negativamente e pelos cátions do tampão utilizado. Esses cátions são atraídos para a extremidade do capilar na qual se encontra o cátodo e, devido aos efeitos de solvatação, arrastam moléculas de solvente bem como os demais solutos. A consequência deste efeito é que todas as espécies, independentemente da carga, se deslocam em direção ao cátodo. A ordem de eluição, no entanto, dependerá da carga do íon e de sua mobilidade eletroforética. Normalmente, a ordem de eluição observada é a seguinte: cátions de elevada mobilidade, cátions de baixa mobilidade, espécies neutras e, finalmente, ânions (Holler; Skoog; Crouch, 2009).

Em uma análise por eletroforese capilar, a amostra é introduzida em uma extremidade do capilar (extremidade do ânodo) e o detector é posicionado na outra extremidade (extremidade do cátodo). Dentre as características que tornam a eletroforese capilar muito atrativa destacam-se: elevada frequência analítica, elevada eficiência de separação e uso de volumes de amostra e de reagentes extremamente reduzidos. Outro atrativo dessa técnica é a versatilidade quanto ao sistema de detecção, sendo os detectores espectrofotométricos e os eletroquímicos os mais frequentemente empregados para a quantificação de ânions inorgânicos em bioetanol.

Além da eletroforese capilar, é possível encontrar trabalhos na literatura envolvendo o desenvolvimento de métodos para determinação de ânions em bioetanol utilizando outras técnicas instrumentais como cromatografia iônica (Herrmann; Chassiniol; Thomas, 2007) fluorescência de raio X por energia dispersiva (Teixeira et al., 2009), espectrofotometria UV/Vis (Oliveira; Korn, 2006) e técnicas eletroanalíticas como titulação condutométrica (Avelar; Barbeira, 2007), voltametria de redissolução catódica (Ferreira; Lima; Barbeira, 2008) e amperometria (Paula et al., 2008). No texto abaixo segue uma breve descrição dos trabalhos envolvendo a determinação de espécies aniônicas em bioetanol.

Bruning e Malm (1982), em seu trabalho pioneiro de análise dos contaminantes em bioetanol, determinaram  $\text{CN}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{S}^{2-}$  em diversas usinas produtoras deste biocombustível. As técnicas utilizadas foram a titulação potenciométrica de precipitação para  $\text{Cl}^-$  e  $\text{S}^{2-}$ , a colorimetria para  $\text{CN}^-$  e a gravimetria para  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Munoz et al. (2004) determinaram  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{NO}_3^-$  em bioetanol por eletroforese capilar utilizando detecção eletroquímica sem contato. Este sistema detecção baseia-se na medida de condutividade sem contato com a solução. Esse trabalho permitiu a quantificação simultânea de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{NO}_3^-$  e outros cátions em bioetanol de maneira simples, rápida e com elevada confiabilidade. A calibração foi realizada utilizando o íon lactato como padrão interno para os ânions. O pré-tratamento da amostra utilizado no método foi a completa evaporação do etanol seguida pela redissolução do resíduo obtido em água deionizada. Os limites de detecção alcançados nesse trabalho em  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram de 60, 80, 80 respectivamente para  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , e  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Pereira et al. (2004) desenvolveram um método para determinar  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  utilizando a eletroforese capilar de zona com detecção indireta por UV. A determinação foi feita utilizando eletrólito contendo o cromóforo cromato e brometo de hexametônio como modificador de fluxo osmótico. Nesse trabalho as amostras foram preparadas por evaporação do etanol e posterior redissolução em água deionizada. Com este procedimento foram obtidas curvas analíticas com faixa linear de 0,065–0,65  $\text{mg kg}^{-1}$  para o  $\text{Cl}^-$  e 0,25–4,0  $\text{mg kg}^{-1}$  para o  $\text{SO}_4^{2-}$ . Os limites de detecção alcançados em  $\text{mg kg}^{-1}$  foram de 0,041 para o  $\text{SO}_4^{2-}$  e 0,033 para o  $\text{Cl}^-$ . Os resultados de estudos de recuperação obtidos ficaram na faixa de 85,4–103,3%. Comparações feitas com o método oficial para análises destes ânions em amostras de bioetanol mostraram resultados compatíveis.

Pereira et al. (2006), novamente utilizando a eletroforese capilar, determinaram  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e outras espécies orgânicas em bioetanol em meio de nitrato e ácido monocloraacético com detecção indireta por UV. Nesse trabalho os autores utilizaram nitrato como cromóforo, o que é vantajoso devido à toxicidade do cromato que foi previamente utilizado como cromóforo por esses autores. Esta mudança não trouxe prejuízo ao método, o qual se mostrou capaz de determinar quantidades muito abaixo dos limites recomendados pela legislação. Os limites de detecção alcançados Neste trabalho foram de 27  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o  $\text{SO}_4^{2-}$  e 16  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para o  $\text{Cl}^-$ .

Herrmann, Chassinol e Thomas (2007) desenvolveram um método para determinação de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  em etanol utilizando uma técnica de injeção direta em cromatografia iônica. Em contraste com as outras técnicas de supressão, o novo método proporciona uma linha de base estável a cada injeção. As propriedades dinâmicas desta técnica permitem uma capacidade supressora suficientemente independentemente da força iônica do eluente.

As técnicas eletroquímicas têm sido utilizadas em sistemas de detecção em cromatografia iônica e eletroforese capilar; no entanto, elas também têm contribuído consideravelmente para a determinação de ânions inorgânicos em bioetanol por meio da aplicação direta destas técnicas nas análises, fato que pode ser verificado nos trabalhos que seguem descritos abaixo.

Avelar e Barbeira (2007) desenvolveram dois métodos utilizando a técnica de titulação condutométrica para determinação de  $\text{Cl}^-$ , com solução de  $\text{AgNO}_3$ , e para a determinação da acidez total, com solução de  $\text{NaOH}$ , em bioetanol. Os estudos de recuperação ficaram na faixa de 98,3-101,5% para o  $\text{Cl}^-$  e 98,7-102,7% para a acidez total. Os resultados obtidos em análises de amostras de bioetanol, comparando com o método oficial, foram satisfatórios. O limite de detecção alcançado para  $\text{Cl}^-$  foi de  $0,88 \text{ mg L}^{-1}$  e para a acidez total foi de  $3 \text{ mg L}^{-1}$ .

Ferreira, Lima e Barbeira (2008) determinaram  $\text{Cl}^-$  utilizando a técnica de voltametria de redissolução catódica com eletrodo gotejante de mercúrio com apenas 10 s de deposição sob agitação. O método foi comparado com a determinação potenciométrica obtendo-se resultados compatíveis entre si e com menor limite de detecção, que foi de  $0,040 \text{ mg L}^{-1}$ , para o método voltamétrico desenvolvido.

Paula et al. (2008) empregaram um sistema FIA (*flow injection analysis*) com detecção amperométrica para a quantificação de  $\text{Cl}^-$  em bioetanol utilizando um eletrodo de carbono vítreo recoberto por um filme de polianilina. O método é baseado no fato dos processos redox da anilina dependerem da incorporação/expulsão de ânions na estrutura do filme polimérico para que a eletroneutralidade deste seja mantida. O processo de incorporação/expulsão atribui ao filme seletividade para ânions de pequeno raio de hidratação, como o  $\text{Cl}^-$ . As análises por injeção em fluxo foram realizadas empregando-se glicina como solução carregadora, mantendo o potencial do eletrodo de trabalho em um valor suficientemente positivo para que o filme de polianilina sofresse oxidação, na presença de íons cloreto. O método

permitiu a análise direta das amostras comerciais de bioetanol dispensando qualquer procedimento de pré-tratamento da amostra. Este método mostrou resultados compatíveis aos obtidos pelo método oficial em análises de amostras de bioetanol e limite de detecção de  $3,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

Teixeira et al. (2009) desenvolveram um método para a quantificação simultânea de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  em bioetanol empregando a técnica de fluorescência de raio X por energia dispersiva EDXRF (*energy dispersive X-ray fluorescence*). A análise baseou-se na precipitação destes ânions como  $\text{AgCl}$  e  $\text{BaSO}_4$  e após uma etapa de filtração, os sais ficaram retidos em papel de filtro, sendo este diretamente analisado por EDXRF. Os teores de  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{Cl}^-$  foram, então, determinados indiretamente por meio das linhas espectrais da prata e do bário. Este método mostrou-se eficiente e confiável mediante estudo de recuperação e comparação com o método oficial para a quantificação simultânea de  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{Cl}^-$  em bioetanol. O fato de os precipitados poderem ser analisados diretamente no papel de filtro conferiu grande praticidade ao método analítico proposto. Os limites de detecção alcançados em  $\mu\text{g L}^{-1}$  foram 30 e 25 respectivamente para o sulfato e cloreto.

Oliveira e Korn (2006) utilizaram um sistema de análise por injeção sequencial SIA (*sequential injection analysis*) com detecção espectrofotométrica para a quantificação de  $\text{SO}_4^{2-}$  em bioetanol. O método é baseado na reação química entre o  $\text{SO}_4^{2-}$  e o complexo de bário com dimetilsulfonazo(III). O sulfato desloca o bário do complexo, formando o precipitado  $\text{BaSO}_4$  e liberando o complexante orgânico. O complexo orgânico absorve fortemente em 665 nm. Assim, a diminuição da absorbância em 665 nm causada pelo deslocamento do bário foi empregada como sinal analítico para a quantificação deste ânion em bioetanol. O pré-tratamento requerido pelo método foi a queima da amostra seguida pela dissolução das cinzas em água deionizada. Este método apresentou um limite de detecção de  $0,27 \text{ mg L}^{-1}$ , valor bem abaixo da concentração máxima de sulfato permitida pela ANP, e resultados em análises de bioetanol compatíveis com os obtidos pelo método oficial.

Os métodos analíticos desenvolvidos para a quantificação de ânions inorgânicos em bioetanol discutidos anteriormente são caracterizados por excelente desempenho analítico, permitindo análises rápidas e confiáveis com baixíssimos requisitos quanto ao pré-tratamento da amostra. Verificou-se uma predominância da técnica de eletroforese capilar, pois esta permite



a análise simultânea de ânions com baixo consumo de amostra e reagentes. Em relação aos sistemas de detecção, existe forte prevalência das técnicas espectrofotométricas e eletroquímicas que são caracterizadas por elevada sensibilidade aliada a um custo instrumental relativamente baixo. Essa grande variedade de métodos analíticos com comprovada eficiência é extremamente importante para o controle de qualidade do bioetanol, pois permite pôr em prática normas técnicas mais flexíveis e que admitam mais de um método analítico tornando-as mais versáteis e, portanto, mais fáceis de serem adotadas.

## **Análise de espécies orgânicas em bioetanol combustível**

Os principais contaminantes orgânicos presentes no bioetanol compreendem uma grande quantidade de compostos e podem ser divididos em duas categorias: substâncias mais voláteis e menos voláteis que o bioetanol, uma vez que este combustível é obtido por destilação. Os contaminantes menos voláteis são denominados “álcoois superiores” e são constituídos principalmente pelos álcoois n-propílico, isobutílico e isoamílico. O grau de ocorrência destes compostos no produto final é variável e diretamente dependente da eficiência do processo de destilação empregado nas usinas de produção. Os contaminantes mais voláteis que o etanol constituem suas impurezas quantitativamente mais significativas e são constituídos principalmente por metanol, acetaldeído/acetil, acetato de etila, outros ésteres, cetonas, furfuraldeído e aldeídos superiores.

No entanto, estes contaminantes constituem uma mistura de componentes químicos muito instáveis ou reativos entre si, sendo que suas proporções tendem a alterar-se no decorrer da produção, posterior estocagem e distribuição do produto (Bruning; Malm, 1982). Soma-se a isso, ainda, que a queima parcial ou incompleta desse combustível ou a sua evaporação representam uma grande fonte de emissão destas substâncias para a atmosfera, sendo que alguns destes compostos são reconhecidamente carcinogênicos e/ou mutagênicos dependendo do grau e tempo de exposição (Who, s. d.).

Mesmo diante de todos os argumentos apresentados anteriormente, verifica-se na literatura científica especializada que a análise da maioria desses contaminantes no bioetanol não está completamente sistematizada

e nem se inclui como parte dos requisitos preconizados nas normas oficiais da ABNT, ASTM ou ECS para o controle de qualidade desse combustível.

Com o aprimoramento das tecnologias disponíveis atualmente, os métodos de análise instrumentais, como métodos cromatográficos (Bruning; Malm, 1982; Saczk et al., 2005a; Saczk et al., 2005b; Saczk et al. 2006; Coutrim; Nakamura; Collins, 1993; Vilar et al., 2003), de análise por injeção sequencial (Vilar et al., 2003), eletroforese capilar (Pereira et al., 2006), espectrofotométricos (Teixeira et al., 2004) e eletroquímicos (Rodgher et al., 2006; Romanini; Trindade; Zanoni, 2009; Rodgher et al., 2006; Saczk et al., 2002), têm sido utilizados para a detecção e quantificação de diversos contaminantes orgânicos no bioetanol, validando esses métodos instrumentais como uma possibilidade real de utilização na análise desses contaminantes. Percebe-se, ainda, a alta confiabilidade destes métodos associada aos baixos limites de detecção, elevada sensibilidade e seletividade, características que permitiram uma série de inovações tecnológicas em termos de controle de qualidade do etanol, permitindo também a introdução de novas normas oficiais e a melhoria das já existentes, levando a uma análise mais detalhada da composição deste biocombustível.

As contribuições analíticas mais recentes em relação ao desenvolvimento das técnicas alternativas na análise de traços de compostos orgânicos em etanol são relatadas nesta seção e estão sumarizadas na Tabela 26.5.

De acordo com a literatura, o primeiro estudo independente e pioneiro sobre a determinação de espécies químicas em bioetanol foi realizado na década de 1980 por Bruning e Malm (1982). Foram analisadas amostras de bioetanol obtidas de diferentes destilarias e verificou-se que, independentemente da origem do bioetanol, seus principais contaminantes orgânicos foram sempre o propionato de etila e o acetal. Nesse estudo foi detectada apenas uma pequena quantidade de acetaldeído, reconhecidamente um dos principais contaminantes do bioetanol, e grande quantidade de acetal. Segundo os autores, a produção do acetal por meio da reação entre o bioetanol e o acetaldeído ocorre durante o armazenamento deste combustível, sendo esta reação responsável pela baixa concentração de acetaldeído encontrada. Assim, esse trabalho demonstrou que o bioetanol e seus contaminantes constituem uma mistura de componentes químicos muito reativos entre si e, portanto, suas proporções tendem a sofrer alterações no decorrer da estocagem.

Tabela 26.5 – Metodologias analíticas desenvolvidas para a análise de contaminantes orgânicos em bioetanol comercial

Analito	Técnica	Limite de Detecção	Referência
2-furfuraldeído	LSV	35,2 mg L <sup>-1</sup>	Saczk et al., 2002
	HPLC-ED	1,7 ng L <sup>-1</sup>	Saczk et al., 2006
5-hidróximetil furfural	HPLC-ED	1,8 ng L <sup>-1</sup>	Saczk et al., 2006
Acetaldeído	GC	N/E	Bruning; Malm, 1982
	CE	0,45 mg L <sup>-1</sup>	Pereira et al., 2004
	HPLC-UV vis	0,00203 mg L <sup>-1</sup>	Saczk et al., 2005a
	HPLC-ED	0,00380 mg L <sup>-1</sup>	Saczk et al., 2005b
	SWV	0,0359 mg L <sup>-1</sup>	Rodgher et al, 2006b
	SWV	0,0105 mg L <sup>-1</sup>	Rodgher et al, 2006a
Acetato de metila	GC	N/E	Bruning; Malm, 1982
Acetato isopropílico	GC	N/E	Bruning; Malm, 1982
Álcoois superiores	GC	N/E	Bruning; Malm, 1982
Aldeídos totais	SIA-HPLC-UV/vis	0,060 mg L <sup>-1</sup>	F. S. Oliveira et al., 2005
Butiraldeído	HPLC-ED	1,9 ng L <sup>-1</sup>	Saczk et al., 2006
Dietil éter	GC	N/E	Bruning; Malm, 1982
Dimetil éter	GC	N/E	Bruning; Malm, 1982
Dimetilcetona	CE	0,58 mg L <sup>-1</sup>	Pereira et al., 2004
	HPLC-ED	2,0 ng L <sup>-1</sup>	Saczk et al., 2006
	GC	N/E	Bruning; Malm, 1982
Formaldeído	GC	N/E	Bruning; Malm, 1982
	FIA – UV vis	0,030 mg L <sup>-1</sup>	Teixeira et al., 2004
Formiato de etila	GC	N/E	Bruning; Malm, 1982
Metanol	GC	N/E	Bruning; Malm, 1982
Metanol	FTIR	N/E	Carneiro et al., 2008
Metil-etilcetona	HPLC-ED	1,8 ng L <sup>-1</sup>	Saczk et al., 2006
Propanaldeído	GC	N/E	Bruning; Malm, 1982
Propionato de etila	GC	N/E	Bruning; Malm, 1982
Solvente Orange 7	SWV	0,0249 mg L <sup>-1</sup>	Romanini; Trindade; Zanoni et al., 2009

N/E = não especificado; CE = eletroforese capilar; UV Vis = espectrofotometria molecular no ultravioleta e visível; GC = cromatografia em fase gasosa, HPLC-UV Vis = cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta e visível; HPLC-ED = cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica; FIA-UV Vis = análise por injeção em fluxo com detecção no ultravioleta e visível; FTIR = infravermelho com transformada de Fourier; SWV = voltametria de onda quadrada; LSV = voltametria de varredura linear.

As técnicas de separação HPLC (*high performance liquid chromatography*) e GC (*gas chromatography*) são as mais utilizadas para a determinação de compostos carbonílicos em matriz alcoólica, porém a determinação direta destes compostos não é observada, devido à baixa sensibilidade apresentada na detecção espectrofotométrica. No entanto, essa limitação pode ser contornada por meio da derivatização, ou seja, a transformação de um composto, usando um derivado apropriado, em outro composto de fácil detecção por UV/Vis.

Como o bioetanol atualmente é uma *commodity* importante no cenário mundial, uma consequência direta do crescente interesse por este produto é a constatação da publicação de um grande número de artigos científicos nos últimos anos no que se refere ao controle de qualidade deste biocombustível. Dessa forma, uma descrição resumida dos trabalhos envolvendo a determinação de contaminantes orgânicos em bioetanol é fornecida logo a seguir.

Sacz et al. (2005a, 2005b) determinaram acetaldeído utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, com detector espectrofotométrico UV-vis (2005a) e com detector eletroquímico (2005b). Ambos os métodos são baseados na derivatização do acetaldeído com 2,4-dinitrofenilhidrazina, DNPH, cujo produto pode ser detectado tanto espectrofotometricamente quanto eletroquimicamente. Os métodos utilizados pelos autores foram aplicados para a quantificação de acetaldeído em amostras comerciais de bioetanol. O método utilizando detecção espectrofotométrica alcançou limites de detecção de  $2,03 \mu\text{g L}^{-1}$  e recuperação com valores entre 98,7-102%. Já o método com detecção eletroquímica alcançou o limite de detecção de  $3,80 \mu\text{g L}^{-1}$  e estudos de recuperação com valores entre 99-102%. Os teores de acetaldeído encontrados nas amostras de bioetanol variaram entre 61,5 e  $201 \text{ mg L}^{-1}$ .

Sacz et al. (2006) determinaram 5-hidroxifurfural, 2-furfuraldeído, butiraldeído, acetona e metiletilcetona derivatizados com 2,4-dinitrofenilhidrazina, DNPH, utilizando HPLC-ED. Os compostos derivatizados foram separados em coluna de fase reversa sob condições isocráticas de mistura binária de metanol/LiCl(aq). A detecção foi feita com eletrodo de carbono vítreo possibilitando faixa linear de 5 a  $400 \text{ ng mL}^{-1}$ , um limite de detecção de 1,7 a  $2,0 \text{ ng mL}^{-1}$  e recuperação analítica na faixa de 95-103% utilizando um volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ .

Coutrim, Nakamura e Collins (1993) separaram e quantificaram cetonas e aldeídos produzidos durante a combustão em motores de automóveis, utilizando a mistura bioetanol-gasolina. Esse método envolveu a derivatização dos analitos com o dinitrofenilhidrazina, DNPH, e monitoramento dos produtos obtidos por HPLC com detector UV-Vis utilizando comprimento de onda de 254 e 365 nm. Os limites de detecção obtidos para as espécies estudadas foram inferiores a  $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Vilar et al. (2003) utilizaram a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) para a caracterização dos constituintes orgânicos do bioetanol anidro. As amostras foram preparadas passando por uma etapa de separação com cromatografia líquida em uma coluna preparativa contendo sílica gel ativada e, posteriormente, as frações foram analisadas por GC-MS. Os principais contaminantes encontrados nesta matriz foram compostos aromáticos, hidrocarbonetos e compostos oxigenados como aldeídos, cetonas e álcoois. Nesse trabalho foi apresentada a identificação de cerca de 55 espécies orgânicas utilizando cromatografia gasosa, seguido pela aquisição do espectro de massa e posterior comparação com os dados espectrais a partir da biblioteca do equipamento. Nesse estudo, os hidrocarbonetos saturados lineares e hidrocarbonetos aromáticos foram eluídos na primeira fração e compostos oxigenados como aldeídos, cetonas e álcoois eluídos na segunda fração, quando o n-hexano, n-hexano-benzeno (1:1, v/v) e diclorometano foram usados como fases móveis. Uma terceira fração com baixa resolução cromatográfica também foi obtida.

Oliveira et al. (2005) desenvolveram um método analítico para a determinação de aldeídos totais em bioetanol empregando um sistema de análise por injeção sequencial com detecção espectrofotométrica. A detecção foi baseada na formação de um composto azul, produto da reação de aldeídos alifáticos com 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona (MBTH) em presença de  $\text{Fe}^{3+}$ . Com o objetivo de maximizar a velocidade da reação entre os aldeídos e o MBTH, a bobina reacional foi inserida em um forno de micro-ondas doméstico. O intervalo linear de resposta do método foi de 0,3 a  $6 \text{ mg L}^{-1}$ , com limite de detecção de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ , sendo obtida uma frequência analítica de 10 determinações por hora. O método analítico desenvolvido foi empregado para a quantificação de aldeídos totais em amostras de bioetanol combustível, sendo os resultados comparados aos obtidos com a técnica

de HPLC utilizando 2,4-dinitrofenilhidrazina como agente derivatizante. Os autores observaram que ambos os métodos forneceram resultados concordantes entre si, sendo que os teores de aldeídos presentes nas diferentes amostras analisadas foram de 90 a 1290 mg L<sup>-1</sup>.

Pereira et al. (2006) empregaram a técnica de eletroforese capilar para a determinação de dimetil cetona, acetaldeído e formaldeído em bioetanol utilizando o procedimento de derivação de aldeídos e cetonas com 3-metil-2-benzotiazolona-hidrazona (MBTH). As espécies foram formadas e, após isso, detectadas espectrofotometricamente em 216 nm. Essa metodologia permitiu a determinação das espécies orgânicas no intervalo linear de 32,0 – 91,3 mg L<sup>-1</sup>, com limites de detecção entre 0,45 e 0,58 mg L<sup>-1</sup> respectivamente para acetaldeído e acetona e recuperação analítica entre 93,8-99,7%.

Teixeira et al. (2004) determinaram formaldeído por meio da determinação do produto da reação deste composto com a espécie Fluoral P por espectrofotometria UV-Vis em 412 nm. O produto a reação entre formaldeído e Fluoral P foi quantitativamente retido em uma coluna C<sub>18</sub> possibilitando a detecção após sua eluição. A utilização da injeção em fluxo (FIA) permitiu a determinação de formaldeído na faixa de 0,050 – 1,5 mg L<sup>-1</sup>, com um limite de detecção de 30 µg L<sup>-1</sup> e uma frequência analítica de 20 determinações por hora.

Rodgher et al. (2006a) utilizaram técnica de voltametria de onda quadrada com eletrodo de gota pendente de mercúrio, para a determinação de aldeídos totais em amostras de bioetanol hidratado. O método foi baseado na derivatização dos aldeídos presentes na amostra com sulfato de hidrazina e posterior detecção dos compostos derivatizados por meio do monitoramento do pico voltamétrico relativo à redução destes compostos. Os experimentos voltamétricos foram conduzidos em meio de tampão acetato pH 5,0 e o tempo de reação entre os aldeídos e a hidrazina foi de 8 min. O método foi empregado para a quantificação de aldeídos totais em cinco amostras comerciais de bioetanol. Os teores de aldeídos totais encontrados nas amostras comerciais variaram entre 2 e 8 mmol L<sup>-1</sup>, indicando que os aldeídos são contaminantes orgânicos presentes em grande quantidade no bioetanol. Os resultados obtidos em estudos de recuperação ficaram entre 95 e 101 % e o limite de detecção alcançado foi de 2,38x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>. Estes resultados indicam que o método analítico desenvolvido pode ser empregado com êxito para a determinação de aldeídos em amostras comerciais de bioetanol.

Romanini et al. (2009) desenvolveram um método eletroanalítico rápido e preciso para a determinação do corante *solvent orange 7* (SO-7), usado comercialmente como um marcador em amostras de bioetanol. O SO-7 foi oxidado em uma mistura de solução tampão Britton-Robinson com N, N- dimetilformamida em um eletrodo de carbono vítreo e apresentou um pico de oxidação bem definido em torno +0,70 V vs. Ag/AgCl, que foi monitorado por voltametria de varredura linear (LSV) e voltametria de onda quadrada (SWV). Utilizando a técnica SWV, foi possível obter uma relação linear entre a corrente de pico e a concentração de corante SO-7 no intervalo de  $4,0 \times 10^{-6}$  a  $18,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> e limite de detecção de  $0,90 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso na quantificação direta do SO-7 em amostras comerciais de bioetanol combustível, resultando em uma recuperação analítica de 97,2-98,4%.

Rodgher et al. (2006b) determinaram acetaldeído em bioetanol utilizando voltametria de pulso diferencial para detectar o produto da derivatização entre acetaldeído e 2,4-dinitrofenilhidrazina. Este método possibilitou a determinação desta espécie na presença de 0,1 mol L<sup>-1</sup> de perclorato de tetrametilamônio após 10 min de reação. O método possibilitou uma faixa linear de  $1,00 \times 10^{-6}$  a  $1,00 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e um limite de detecção de  $8,14 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>. Os resultados de recuperação, 98-101%, mostraram boa exatidão do método.

Saczek et al. (2002) determinaram 2-furfuraldeído em bioetanol e água utilizando eletrodo de carbono vítreo e LiCl e LiOH como eletrólitos-suporte. O método desenvolvido possibilitou uma faixa de trabalho de  $9,5 \times 10^{-4}$  a  $5,8 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e um limite de detecção de  $8,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.

Carneiro et al. 2008 desenvolveram um método para determinar metanol em bioetanol utilizando um modelo de calibração por regressão dos mínimos quadrados parciais em espectroscopia de infravermelho médio e próximo com transformada de Fourier. O método desenvolvido foi comparado com o método de referência utilizando a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama e os resultados obtidos foram compatíveis, mostrando melhor exatidão nos resultados obtidos pelo método desenvolvido pelos autores.

Do total de contaminantes orgânicos avaliados nos trabalhos citados, pode-se destacar mais de uma dezena de substâncias que podem interferir

nas propriedades do combustível, assim como afetar o meio-ambiente e diminuir a vida útil de peças e dos motores dos veículos. De uma maneira geral, os procedimentos analíticos empregados para o monitoramento de contaminantes orgânicos são realizados majoritariamente por meio de métodos cromatográficos acoplados aos detectores espectrofotométricos, enquanto os métodos eletroanalíticos aparecem como uma alternativa satisfatória na análise desses contaminantes e, também, como uma ferramenta analítica para validação dos métodos usados oficialmente. Embora grande parte dos métodos desenvolvidos ainda não seja utilizada como métodos oficiais de análise pelas agências reguladoras nacionais e internacionais, é visível que a maioria deles possui seletividade e sensibilidade suficientes para o propósito de monitoramento nos níveis de contaminação desse combustível.

## Conclusões

Os novos métodos analíticos descritos na literatura para avaliação da qualidade do bioetanol representam atualmente um número muito maior do que os métodos oficiais utilizados para aferir a qualidade deste biocombustível, mostrando a existência de uma grande preocupação com a sua qualidade.

No desenvolvimento destes novos métodos analíticos prevalece uma maior ocorrência de determinações de espécies inorgânicas, principalmente de íons metálicos, em comparação com as determinações de espécies orgânicas, diminuição esta possivelmente decorrente da complexidade biológica da matriz estudada.

Nos novos métodos analíticos desenvolvidos para aferir a qualidade do bioetanol existe uma grande predominância dos métodos espectroscópicos para a determinação de espécies inorgânicas, principalmente metais, ao passo que em relação às espécies orgânicas existe uma maior incidência de métodos cromatográficos.

As técnicas instrumentais utilizadas nestes novos métodos mostram a existência de um número maior de técnicas isoladas em relação às técnicas acopladas, por exemplo, GC/MS e ICP/MS, tanto para espécies orgânicas quanto para espécies inorgânicas no desenvolvimento dos novos métodos para a avaliação da qualidade do bioetanol.



As perspectivas de desenvolvimento de novos métodos analíticos apontam para a determinação de outras espécies químicas além daquelas normalmente avaliadas pelas agências reguladoras e para a busca de limites menores do que os atualmente utilizados para a avaliação da qualidade do bioetanol.

Concluindo, a pesquisa por novos métodos analíticos para avaliação da qualidade do bioetanol poderá contribuir de maneira significativa para assegurar a sustentabilidade da utilização deste biocombustível, pois está composta de um acervo com muitas opções de métodos analíticos para esta matriz com eficiência demonstrada.

## Referências bibliográficas

- AMORIM, V. R.; CALDAS, N. M.; RAPOSO, J. L.; FLUMIGNAN, D. L.; OLIVEIRA, J. E.; NETO, J. A. G. *At. Spectrosc.*, v.29, p.230-5, 2008.
- ANP. Resolução ANP n.7, de 9.2.2011, Anexo: Regulamento Técnico ANP n.3, 2011. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll?f=id&id=RANP%207%20-%202011> Acesso em: jul. 5, 2007.
- AVELAR, H. M.; BARBEIRA, P. J. S. *Fuel*, v.86, p.299-302, 2007.
- BERGAMINI, M. F.; SANTOS, A. L.; STRADIOTTO, N. R. *Eclét. Quím.*, v.31, p.45-52, 2006.
- BRUNING, I. M. R. A.; MALM, E. B. *Bol. Tec. Petrobrás*, v.25, p.217-28, 1982.
- CARNEIRO, H. S. P.; MEDEIROS, A. R. B.; OLIVEIRA, F. C. C.; AGUIAR, G. H. M.; RUBIM, J. C.; SUAREZ, P. A. Z., *Energy Fuels*, v.22, p.2767-70, 2008.
- CESARINO I., MARINO, G., CAVALHEIRO, E. T. G., *Fuel*, v.89, p.1883-8, 2010.
- COUTRIM, M. X.; NAKAMURA, L. A.; COLLINS, C. H., *Chromatographia*, v.3-4, p.185-90, 1993.
- DIAS, J. C. et al., *Anal. Methods*, v.2, p.1565-70, 2010.
- F. S. OLIVEIRA, M. KORN. *Talanta*, v.68, p.992-9, 2006.
- FERREIRA, H. B. P.; LIMA, T. A. F.; BARBEIRA, P. J. S. *Electroanalysis*, v.20, p.390-5, 2008.
- FILHO, N. L. D.; GUSHIKEM, Y.; POLITO, W. L.; MOREIRA, J. C.; EHIRIM, E. O. *Talanta*, v.42, p.1625-30, 1995.
- GARCIA, S.; GAUBEUR, I., *J. Braz. Chem. Soc.*, v.22, p.501-10, 2011.
- GIACOMELLI, M. B. O.; SILVA, J. B. B.; SAINT PIERRE, T. D.; CURTIUS, A. *J. Microchem. J.*, v.77, p.151-6, 2004.
- GOMES, L. A. M.; PADILHA, P. M.; MOREIRA, J. C.; FILHO, N. L. D.; GUSHIKEM, Y. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.9, p.494-8, 1998.
- HERRMANN, H.; CHASSINIOL, K.; THOMAS, D. *LaborPraxis*, v.31, p.46-7, 2007.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. 6.ed. Cap.30. In: \_\_\_\_\_. *Princípios de análise instrumental*. Porto Alegre: Bookman, 2009.

- MATTOS, C. S.; CARMO, D. R.; OLIVEIRA, M. F.; STRADIOTTO, N. R. *Int. J. Electrochem. Sci.*, v.3, p.338-45, 2008.
- MOREIRA, J. C.; GUSHIKEM, Y. *Anal. Chim. Acta*, v.176, p.263-7, 1985.
- MUNOZ, R. A. A.; ANGNES, L. *Microchem. J.*, v.77, p.157-62, 2004.
- MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.; JESUS, D. P.; LAGO, C. L.; ANGNES, L. J. *Braz. Chem. Soc.*, v.15, p.523-6, 2004.
- NEVES, E. F. A.; NETO, G. O.; SERRANO, S. H. P. *Anal. Lett.*, v.20, p.1363-77, 1987.
- OLIVEIRA, A. P.; OKUMURA, L. L.; NETO, J. A. G.; DE MORAES, M. *Eclét. Quím.*, v.27, p.285-91, 2002a.
- OLIVEIRA, A. P.; DE MORAES, M.; NETO, J. A. G.; LIMA, E. C. *At. Spectrosc.*, v.23, p.39-43, 2002b.
- . *At. Spectrosc.*, v.23, p.190-5, 2002c.
- OLIVEIRA, F. S.; LEITE, B. C. O.; ANDRADE, M. V. A. S.; KORN, M., *J. Braz. Chem. Soc.*, v.1, p.87-92, 2005.
- OLIVEIRA, M. F.; BALBO, V. R.; DE ANDRADE, J. F.; SACZK, A. A.; OKUMURA, L. L.; STRADIOTTO, N. R. *Chem. Technol. Fuels Oils*, v.44, p.430-4, 2008.
- OLIVEIRA, M. F.; SACZK, A. A.; OKUMURA, L. L.; FERNANDES, A. P.; DE MORAES, M.; STRADIOTTO, N. R. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.380, p.135-40, 2004.
- OLIVEIRA, M. F.; SACZK, A. A.; OKUMURA, L. L.; STRADIOTTO, N. R. *Eclét. Quím.*, v.27, p.153-60, 2002.
- . *Energy Fuels*, v.23, p.4852-9, 2009.
- PADILHA, P. M.; PADILHA, C. C. F.; ROCHA, J. C. *Quim. Anal.*, v.18, p.299-303, 1999.
- PAULA, D. T.; YAMANAKA, H.; OLIVEIRA, M. F.; STRADIOTTO, N. R. *Chem. Technol. Fuels Oils.*, v.44, p.435-40, 2008.
- PEREIRA, E. A.; STEVANATO, A.; CARDOSO, A. A.; TAVARES, M. F. M. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.380, p.178-82, 2004.
- PEREIRA, E. A.; TAVARES, M. F. M.; STEVANATO, A.; CARDOSO, A. A. *Quim. Nova.*, v. 29, p.66-71, 2006.
- ROCHA, M. S., MESKO, M. F., SILVA, F. F. et al. *J. Anal. At. Spectrom.*, v.26, p.456-61, 2011.
- RODGHER, V. S.; OKUMURA, L. L.; SACZK, A. A.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B., *J. Anal. Chem.*, v.61, p.889-95, 2006b.
- RODGHER, V. S.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B.; BARROS, A. A. *Quím. Nova*, v.4, p.662-5, 2006a.
- ROLDAN, P. S.; ALCANTARA, I. L.; CASTRO, G. R.; ROCHA, J. C.; PADILHA, C. C. F.; PADILHA, P. M. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.375, p.574-7, 2003.
- ROMANINI, D. C.; TRINDADE, M. A. G.; ZANONI, M. V. B., *Fuel*, v.88, p.105-9, 2009.
- SACZK, A. A.; OKUMURA, L. L.; OLIVEIRA, M. F.; STRADIOTTO, N. R. *Eclét. Quím.* v.27, p.141-51, 2002.
- SACZK, A. A.; OKUMURA, L. L.; OLIVEIRA, M. F.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B. *Anal. Bioanal. Chem.*, v.8, p.1619-1624, 2005a.

- . *Anal. Sci.*, v.4, p.441-4, 2005b.
- . *Chromatographia*, v.63, p.45-51, 2006.
- SAINT'PIERRE, T. D.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J.; TORMEN, L. J. *Anal. At. Spectrom.*, v.21, p.1340-4, 2006a.
- SAINT'PIERRE, T. D.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. *Talanta*, v.68, p.957-62, 2006b.
- SAINT'PIERRE, T. D.; MARANHÃO, T. A.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J.; AUCELIO, R. Q. *Quím. Nova*, v.31, p.1626-30, 2008.
- SILVA, E. L.; BUDZIAK, D.; CARASEK, E., *Anal. Lett.*, v.37, p.1909-24, 2004.
- SILVA, J. A. F.; LAGO, C. L. *Anal. Chem.*, v.70, p.4339-43, 1998.
- STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B.; FRAGA, I. C. S.; BORGES, P. P. Cap. 21. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). *Bioetanol de cana-de-açúcar*. São Paulo: E. Blücher, 2010, p.992.
- TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L.; MEDEIROS, M. J.; STRADIOTTO, N. R. *Microchim. Acta*, v.164, p.101-6, 2009.
- TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L.; PADILHA, P. M.; STRADIOTTO, N. R. *Talanta*, v.71, p.771-7, 2007a.
- . *Anal. Chim. Acta*, v.584, p.295-301, 2007b.
- TARTAROTTI, F. O.; OLIVEIRA, M. F.; BALBO, V. R.; STRADIOTTO, N. R. *Microchim. Acta*, v.155, p.397-401, 2006.
- TEIXEIRA, L. S. G.; BEZERRA, M. A.; LEMOS, V. A.; SANTOS, H. C.; JESUS, D. S.; COSTA, A. C. S., *Sep. Sci. Technol.*, v.40, p.2555-65, 2005.
- TEIXEIRA, L. S. G.; BRASILEIRO, J. F.; BORGES JUNIOR, M. M.; CORDEIRO, P. W. L. *Quím. Nova*, v.29, p.741-45, 2006.
- TEIXEIRA, L. S. G.; CHAVES, T. J.; GUIMARÃES, P. R. B.; PONTES, L. A. M.; TEIXEIRA, J. S. R. *Anal. Chim. Acta.*, v.640, p.29-32, 2009.
- TEIXEIRA, L. S. G.; LEÃO, E. S.; DANTAS, A. F.; PINHEIRO, H. C. L.; COSTA, A. C. S.; ANDRADE, J. B., *Talanta*, v.64, p.711-5, 2004.
- TORMEN, L.; CHAVES, E. S.; SAINT'PIERRE, T. D.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J., *J. Anal. At. Spectrom.*, v.23, p.1300-4, 2008.
- ÚNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar). Disponível em: <http://www.unica.com.br>. Acesso em: 7 nov. 2011.
- VILAR, R. B. C.; SILVA, R.; SCHOSSLER, P.; VESES, R. C.; PIATNICKI, C. M. S.; SAMIOS, D.; CARAMÃO, E. B., *J. Chromatogr., A*, v.985, p.367-73, 2003.
- WHITE PAPER ON INTERNATIONALLY COMPATIBLE BIOFUEL STANDARDS – Tripartite Task Force Brazil, Europe Union and United States, 31 dez. 2007. Disponível em: [http://www.abnt.org.br/imagens/destaques/Biocombustivel\\_WHITE\\_PAPER\\_IBCS.pdf](http://www.abnt.org.br/imagens/destaques/Biocombustivel_WHITE_PAPER_IBCS.pdf).
- WHO (World Health Organization). In: Outdoor air pollution. Disponível em: [http://www.who.int/phe/health\\_topics/outdoorair/en/index1.html](http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair/en/index1.html). Acesso em: 6 nov. 2011.
- ZEMANN, A. J.; SCHNELL, E.; VOLGGER, D.; BONN, G. K. *Anal. Chem.*, v.70, p.563-7, 1998.

## Aspectos relacionados à produção de biodiesel com aproveitamento de resíduos, caracterização e testes de misturas em motores de combustão interna

*Ricardo Alan V. Ramos, Fernando H. Dib,  
Paulo Sérgio B. dos Santos, Lucas M. Scarpin,  
Aparecido C. Gonçalves, Antonio J. Diniz, João Batista C. Silva<sup>1</sup>*

### Introdução

Neste capítulo são apresentados aspectos relacionados à produção de biodiesel, pelo processo de transesterificação e rota metílica, utilizando como matéria-prima o óleo residual reciclado, e posterior aplicação em motores de combustão interna, com destaque para o seu uso conjunto com um gerador de eletricidade. Com isso, visa-se a diversificação da matriz energética brasileira e a minimização dos impactos ambientais decorrentes do descarte inadequado desses óleos.

Para a abordagem desse assunto, inicialmente é feita uma contextualização da demanda energética por combustíveis líquidos em nível mundial e nacional, destacando-se a participação do biodiesel no atendimento desta demanda, assim como a produção deste combustível por meio de fontes renováveis, complementada por uma revisão bibliográfica sobre o assunto.

Na sequência são apresentados dados históricos e de produção do biodiesel em nível mundial e nacional, bem como as matérias-primas disponíveis

---

<sup>1</sup> Os autores agradecem à empresa Biocom Biocombustível S.A. pela doação do reator Biocom 100 e às empresas Granol e Bertin (atualmente Grupo JBS) pelo fornecimento de biodiesel B100 de origem vegetal e animal, respectivamente. Os autores também são gratos à Fapesp pelo financiamento de um projeto de pesquisa (Processo 2005/01197-6) mais amplo no qual estão inseridos os temas abordados.

e os processos produtivos envolvidos, sendo feitos comentários a respeito das propriedades físico-químicas e limites para certificação/especificação do biodiesel.

Outro aspecto importante abordado é a questão das patentes na área de biodiesel, sendo apresentadas as quantidades registradas e a sua distribuição por área de aplicação, assunto este de interesse para um futuro próximo.

Depois de todas essas considerações são apresentados alguns trabalhos que vêm sendo desenvolvidos na área de biodiesel no âmbito do Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen) do Departamento de Engenharia Mecânica da Unesp de Ilha Solteira. Estes incluem desde a etapa da reciclagem do óleo residual de fritura, passando pela produção e caracterização do biodiesel com essa matéria-prima e, por fim, testes em um motor diesel que aciona um gerador de eletricidade e realização de comparação do desempenho com relação ao biodiesel B100 de origem animal (sebo) e vegetal (soja), utilizando vários percentuais de mistura biodiesel-diesel.

Além disso, são apresentados alguns outros trabalhos ainda em fase de desenvolvimento, sendo que dentre estes podem ser destacados a construção de uma miniusina de baixo custo para produção de biodiesel e o desenvolvimento de um sensor para separação da fase glicerol-biodiesel após o processo de decantação da mistura que passou pelo processo de transesterificação, bem como as várias formas de utilização dos subprodutos.

Por fim, são apresentadas algumas considerações e possibilidades para estudos futuros, além das referências bibliográficas usadas.

## Contextualização

No que tange às questões energéticas, há algumas décadas a sociedade tem somado esforços em pesquisas para o uso de energias renováveis, ambientalmente corretas e economicamente viáveis.

De acordo com *International Energy Outlook – 2010* (IEO – 2010), publicado pela Administração de Informações de Energia (*Energy Information Administration – EIA*) do Departamento de Energia dos Estados Unidos, o consumo de energia no mundo foi de 522 quintilhões de joules ( $10^{18}$ J) em 2007 e estima-se que em 2035 o consumo será de 779 quintilhões de joules, conforme representado no Gráfico 27.1.

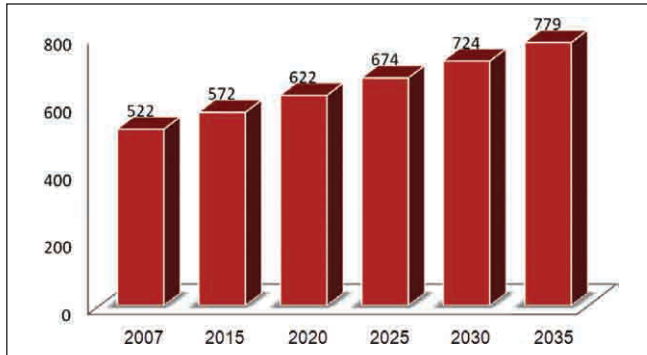


Gráfico 27.1 – Consumo mundial de energia de 2007 a 2035 (10<sup>18</sup> J)

Fonte: Adaptado de EIA (2010)

A emissão de dióxido de carbono em 2007 foi de 29,7 bilhões de toneladas, com uma projeção de 42,4 bilhões de toneladas para 2035, devido à previsão de forte crescimento do produto interno bruto (PIB) ao longo desse tempo, pelas economias emergentes, que resultará em um aumento na demanda de energia (EIA, 2010).

Os países em desenvolvimento, conduzidos pelo BRIC (Brasil, Rússia, Índia e China), serão responsáveis por cerca de 84% desse aumento no consumo de energia, sendo que as fontes de combustíveis fósseis continuarão a fornecer grande parte da energia utilizada no mundo. Já a previsão do consumo das fontes renováveis será de aproximadamente 105 quintilhões de joules, conforme mostrado no Gráfico 27.2.

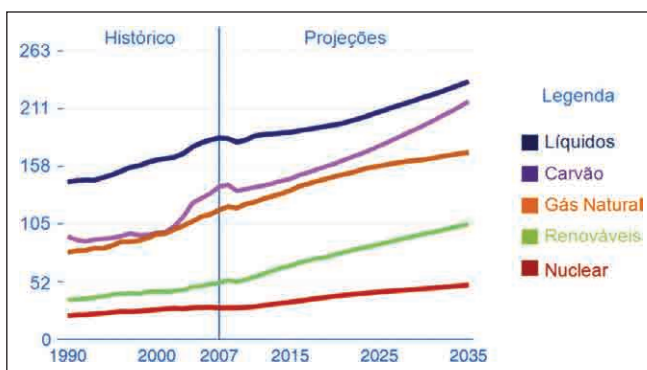


Gráfico 27.2 – Energia consumida no mundo por fonte (10<sup>18</sup> J)

Fonte: Adaptado de EIA (2010)

Conforme representado no Gráfico 27.2, os combustíveis líquidos incluem os derivados de petróleo e não derivados de petróleo como o etanol e o biodiesel, dentre outros.

Estima-se que em 2035 o setor de transportes será responsável por 61% do consumo dos combustíveis líquidos fornecidos mundialmente, conforme representado no Gráfico 27.3 (EIA, 2010).



Gráfico 27.3 – Consumo de combustível líquido por setor (em milhões de barris por dia)

Fonte: Adaptado de EIA (2010)

Para os próximos dez anos, a produção de petróleo e gás natural será expandida de forma acentuada, aumentando 161 e 187%, respectivamente, e a demanda de biocombustíveis líquidos também terá crescimento médio anual de 8,7% para o etanol e 9,8% para o biodiesel, implicando investimentos de R\$ 66 bilhões. Inquestionavelmente, o setor de bioenergia contribuirá imensamente com a geração de emprego e renda no campo e com a dinamização das economias locais (EPE, 2010).

O relatório final do Balanço Energético Nacional de 2010 (BEN, 2010), que apresenta os dados do consumo de energia por setor no Brasil em 2009, mostra que os setores da indústria e de transporte foram responsáveis por cerca de 64,3% da energia consumida no país, conforme representado no Gráfico 27.4.

Em 2007, a frota de veículos no Brasil era de 25,6 milhões, o equivalente a 2,5% do mundo, sendo 20,4 milhões automóveis, 3,3 milhões de veículos comerciais leves, 1,5 milhões de caminhões e quatrocentos mil ônibus (EPE, 2009 apud MCT, 2009).

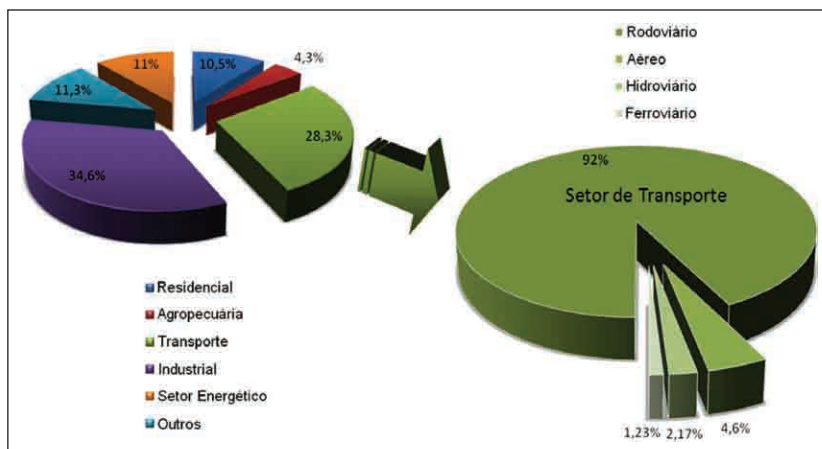


Gráfico 27.4 – Consumo de energia por setor no Brasil em 2009

Fonte: Adaptado de EPE (2010)

Dados do BEN-2010 indicam que o óleo diesel é o combustível mais utilizado para o setor de transporte no Brasil e que no ano de 2009 representou 48,4% do consumo total para este setor, conforme representado no Gráfico 27.5.

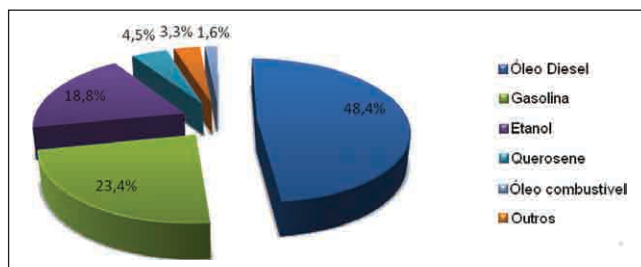


Gráfico 27.5 – Consumo de combustível no setor de transporte no Brasil em 2009

Fonte: Adaptado de EPE (2010)

Segundo o Anuário Estatístico de 2009, da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), em 2008 as importações de derivados de petróleo totalizaram 17,9 milhões de m<sup>3</sup>, volume 12,2% superior ao registrado em 2007. As importações de derivados energéticos em 2008 representaram 54,2% do total e aumentaram 22,8% em relação a 2007.



O óleo diesel foi o derivado energético importado em maior quantidade no ano, contribuindo com 32,5% do volume total importado, o que corresponde a 46% do gasto com as importações de derivados em 2008, que totalizaram US\$ 11,2 bilhões (ANP, 2009).

Historicamente o Brasil é um grande contribuinte para a redução do uso de combustíveis fósseis no mundo, apresentando posição de destaque na tecnologia e produção de etanol e tem intensificado a produção de biodiesel, com o início do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) em 2004, reafirmando, assim, o interesse nos biocombustíveis como caminho natural para a diminuição do uso do petróleo e de seus derivados (MCT, 2009).

Diante desse contexto, pesquisadores brasileiros têm aumentado a busca por medidas mitigadoras ou de reversão aos danos já causados no meio ambiente, com o uso de energias limpas e renováveis, na qual o biodiesel surge como um substituto parcial ou integral do óleo diesel de petróleo, tanto em motores de combustão interna de ciclo diesel automotivo (ônibus, caminhões, tratores etc.) quanto em estacionários (geradores de energia elétrica).

Indubitavelmente, o biodiesel representa um potencial importante para o desenvolvimento energético brasileiro, considerando a perspectiva nacional de que a dimensão e a oportunidade para o mercado desse combustível permitirão o desenvolvimento de toda a sua cadeia produtiva, possibilitando o surgimento e a evolução de novas empresas no setor, as quais contribuirão com o programa de desenvolvimento sustentável e a redução das importações de óleo diesel.

## **Trabalhos relacionados ao assunto**

Além de algumas importantes publicações, como Knothe, Van Gerpen e Krahl (2006) e Van Gerpen et al. (2004), diversas outras contribuíram para o desenvolvimento deste capítulo, e a seguir algumas delas serão apresentadas resumidamente, destacando-se primeiramente as que dizem respeito aos processos de produção de biodiesel por transesterificação de óleos de diferentes origens, incluindo os residuais, por meio de rotas etílicas e/ou metílicas e, depois, aquelas relacionadas com a aplicação desse combustível

em motores de combustão interna, incluindo os destinados a acionamento de geradores de eletricidade.

### **Trabalhos relacionados com a produção de biodiesel por transesterificação**

Costa Neto (2002) estudou a transformação do óleo de soja refinado, degomado e oxidado termicamente (usado em frituras e aquecido em laboratório) em ésteres alquílicos, biodiesel, por meio da reação de transesterificação enzimática usando lipases comerciais e álcoois de cadeias curtas, metanol e etanol hidratado. Foi feita a caracterização física e química dos óleos utilizados e verificada a eficiência do biocatalizador nas reações de transesterificação dos óleos, entre outros parâmetros. Por fim, as características dos ésteres obtidos por via enzimática foram comparadas com as dos mesmos obtidos por via química.

Wust (2004) propôs determinar a viabilidade técnica da obtenção de biodiesel a partir dos resíduos gordurosos desemulsificados. Os estudos iniciaram com a caracterização dos resíduos, com especial atenção à composição em ácidos graxos, teor de umidade e ácidos graxos livres. Uma das principais características destes resíduos é a existência de um elevado teor de ácidos graxos livres, resultantes da degradação da molécula do triglicérido. Após a caracterização, foram avaliados procedimentos para obtenção de ésteres de ácidos graxos, buscando-se uma metodologia adequada para a produção de biodiesel. Estes procedimentos foram baseados em reações de transesterificação com catálise básica e ácida e de esterificação com catálise ácida. Os procedimentos baseados em reações com catálise básica não apresentaram bons resultados e por este motivo foram explorados os procedimentos baseados em reações com catálise ácida. Estas reações foram avaliadas utilizando-se diferentes condições de temperatura e pressão e os rendimentos líquidos observados foram estimados como próximos a 80%.

Ferrari (2005) buscou avaliar a taxa de conversão do óleo neutro de soja em éster etílico (biodiesel) e o rendimento no processo de transesterificação, bem como caracterizá-lo segundo parâmetros químicos e físicos, testando seu consumo em um gerador de energia elétrica. O rendimento do processo de obtenção do biodiesel adotado neste trabalho foi de 97,5%. As perdas estimadas foram de 10%, que sendo reduzidas, em conjunto com

a recuperação do etanol e a comercialização da glicerina, podem tornar o processo viável. Os parâmetros físico-químicos analisados estão de acordo com os limites estabelecidos pela Agência Nacional de Petróleo, Gás e Biocombustíveis (ANP). O melhor desempenho do gerador de energia elétrica foi observado quando se aplica a mistura do biodiesel com diesel de petróleo (B20).

Nascimento et al. (2006) apresentaram informações sobre a construção e montagem de uma miniusina de biodiesel de baixo custo e de fácil operação, capaz de produzir 200 litros de biodiesel por batelada pelo processo de transesterificação usando qualquer tipo de óleo vegetal ou animal com metanol ou etanol, para aplicação na zona rural do estado do Maranhão. A unidade é constituída por quatro tanques, sendo um reator para a preparação do catalisador, um reator principal com aquecimento e agitação por reciclo, um tanque de decantação e lavagem com reaquecimento e sistema de lavagem por borbulhamento e um tanque para recepção do álcool destilado sob pressão reduzida. Todos os tanques foram construídos com tecnologia do Núcleo de Biodiesel da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). A planta foi montada com custo médio de R\$ 50.000,00, equivalente a 10% do investimento mínimo a ser feito na menor planta disponível no mercado até aquele momento. A planta passou por uma fase inicial de testes, habilitando-a para a realização de processos de produção a partir de vários óleos vegetais que já vinham sendo feitos em escala de laboratório.

Wang et al. (2006) pesquisaram um método em duas etapas para obtenção do biodiesel a partir de óleo de fritura usado. Foram adotadas duas etapas para preparar o biodiesel a partir do óleo de fritura usado, cuja acidez apresenta valor de 75,92 mg KOH/g de óleo. Na primeira etapa de produção, os ácidos graxos livres presentes no óleo de fritura usado foram esterificados com metanol, utilizando sulfato de ferro como catalisador, e na segunda etapa, os triglicerídeos presentes no óleo de fritura foram transesterificados com metanol na presença do catalisador KOH. Os resultados mostraram que o sulfato férrico apresentou alta eficiência para esterificação dos ácidos graxos livres com metanol. A taxa de conversão dos ácidos graxos livres alcançou 97,22% quando 2% (em massa) de sulfato férrico foi adicionado à reação contendo metanol e triglicerídeos na proporção 10:1 (razão molar) e reagido a 95°C por 4 horas. O metanol foi evaporado a vácuo, e a transesterificação dos triglicerídeos remanescentes foi realizada a

65°C por 1 hora em um sistema contendo 1% (massa) de hidróxido de potássio e razão molar de 6:1 de álcool em relação aos triglicerídeos. O produto final com 97,02% de biodiesel, obtido após as duas etapas de catalisação, foi analisado por cromatografia gasosa.

Santos et al. (2007) desenvolveram metodologias para a obtenção de ésteres etílicos (biodiesel) a partir dos óleos de soja residual e refinado. Foram realizadas reações de transesterificação alcalina dos óleos de soja residual e refinado variando-se a porcentagem do catalisador hidróxido de sódio na reação (1 ou 2%). Foi avaliada a influência do catalisador na quantidade dos ésteres produzidos (biodiesel), viscosidade, densidade e ponto de névoa. Os resultados demonstraram que uma maior quantidade de ésteres foi obtida, para ambos os óleos, quando empregado 2% de NaOH nas reações de transesterificação.

Morandim et al. (2008) fizeram um estudo comparativo da produção de biodiesel proveniente de óleo de fritura e óleo de soja utilizando-se metanol via catálise básica. Para isso, primeiramente foi determinado o melhor catalisador, o etóxido de sódio em ambos os casos numa concentração de 0,8% no caso do óleo de fritura e de 1% no caso do óleo de soja. Escolhido o catalisador, foram determinados a melhor relação molar óleo/álcool (1:7 para o óleo de fritura e 1:8 para o de soja), a melhor temperatura (50°C para o óleo de fritura e 60°C para o óleo de soja) e o tempo de reação ideal (25 min para o óleo de fritura e 45 min para o óleo de soja), o que possibilitou um rendimento de 80% no primeiro caso e de 94% no segundo caso. Cabe salientar que o biodiesel obtido foi caracterizado por meio de análises físico-químicas (densidade, viscosidade, corrosão ao cobre, índice de acidez, glicerina total e pressão de vapor), estando todos os valores dentro dos limites ideais, e que a porcentagem de conversão foi determinada via cromatografia gasosa (CG) e via titulação de óxido redução.

Oliveira, Dominiki e Santa Maria (2008) estudaram a capacidade de conversão do óleo de soja via rotas metílica e etílica para produção de ésteres (metílicos ou etílicos) empregando o hidróxido de potássio como catalisador. Empregando razão molar álcool/óleo de 6:1, foram variadas as condições de síntese: tipo de álcool (metanol ou etanol), quantidade de catalisador (KOH) e temperatura de reação. Os resultados da rota metílica foram comparados aos obtidos pela rota etílica e analisados por FT-IR (espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier).

Albuquerque et al. (2009) avaliaram as propriedades do biodiesel obtido de diferentes fontes de biomassa (mamona, soja, algodão e canola) e suas misturas binárias preparadas nas concentrações entre 20 e 80% em volume. Foram utilizadas como parâmetro para comparação as especificações do biodiesel impostas pela norma europeia (DIN-14214).

### **Trabalhos relacionados à utilização de biodiesel em motores de combustão interna**

Costa Neto et al. (2000) realizaram testes com biodiesel de óleo de fritura usado em ônibus de transporte urbano tendo sido verificado que, entre 3.000 e 5.000 rpm, a potência efetiva e o torque do motor foram pouco inferiores aos observados com óleo diesel. Não obstante, entre 1.500 e 3.000 rpm, os índices obtidos para ambos foram praticamente idênticos. A maior diferença verificou-se com relação à emissão de fumaça, cuja redução média foi 41,5%, medida em escala Bosch.

Bueno (2003) realizou uma abordagem alternativa para o levantamento da taxa aparente de liberação de energia em motores diesel, promovendo a separação entre a injeção e a queima do combustível, considerando-se a presença de combustível no fluido de trabalho. Os resultados obtidos para a massa total de combustível queimada, sob tal abordagem, mostraram-se consideravelmente realistas. Exemplos da aplicação desta abordagem durante o estudo da combustão de misturas entre óleo diesel e biodiesel em motores de ignição por compressão também foram reportados e discutidos nesse trabalho.

Barbosa et al. (2006) avaliaram a eficiência térmica de um motor à compressão funcionando em momentos distintos com diesel mineral e misturas deste com biodiesel nas proporções B2, B5, B20 e B100. Para realização dos ensaios, foi utilizado um motor ciclo diesel de um trator Valmet 85 ID, modelo MWM-D225-4TVA, de 4 tempos, injeção direta, refrigerado à água com 4 cilindros em linha, cilindrada total de 3.778 cm<sup>3</sup>, taxa de compressão 18:1, com potência nominal segundo o fabricante de 78 CV (58,2 kW) a 2.300 rpm, seguindo-se a metodologia estabelecida pela norma NBR 5484 da ABNT, que se refere ao ensaio dinamométrico de motores de ciclo Otto e Diesel. Concluiu-se que a potência do motor ao utilizar biodiesel foi

pouco inferior àquela desempenhada pelo diesel mineral, chegando a uma redução média de 1,31%.

Bueno (2006) analisou as consequências da adição de biodiesel (éster etílico de soja) ao óleo diesel e estabeleceu relações de causa e efeito entre o desempenho do motor e os processos de combustão e formação de mistura. Por meio do estudo, pôde ser observado que a adição de biodiesel nas concentrações estudadas (B5, B10, B15 e B20) favorece a conversão de exergia do combustível em trabalho de expansão no interior do cilindro, proporcionando uma elevação na eficiência de conversão do combustível. Esta elevação de eficiência possui um impacto operacional relevante, proporcionando uma redução no consumo específico de combustível para as misturas estudadas e ganho de desempenho para a adição de biodiesel em concentrações abaixo da correspondente à mistura B10. Em patamares superiores ao B10, o impacto da eficiência de conversão é superado pelos efeitos da redução de influxo de energia com o combustível, obtendo-se desempenho ligeiramente inferior ao verificado com o óleo diesel. Os resultados apresentados demonstraram a atratividade, sob o ponto de vista operacional, da adição de éster etílico de soja ao diesel sob forma de misturas parciais, sobretudo a mistura B10, que ofereceu as melhores características quanto ao desempenho e ao consumo específico.

Santos, Alves e Nóbrega (2006) realizaram uma análise comparativa do consumo específico de combustível e das emissões reguladas ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_2$  e  $\text{O}_2$ ) de um motor do ciclo diesel estacionário operando com diesel e biodiesel (B100), com rotação constante. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o desempenho do motor operando com os dois combustíveis é próximo. O biodiesel testado mostrou uma pequena desvantagem em relação ao consumo específico diante do diesel. Este fato pode ser explicado devido ao poder calorífico do biodiesel ser inferior ao diesel fóssil. Com relação às emissões, a concentração de dióxido de carbono foi aproximadamente a mesma: em relação à concentração do monóxido de carbono para potência de até 3 kW, a variação foi semelhante para os dois combustíveis, entretanto, para 4 kW, o valor da concentração do gás aumentou de forma inesperada.

Móron Villarreyes et al. (2007) apresentaram um breve resumo sobre a importância das propriedades físicas e sua relação com combustão interna,

propondo um método para determinar a proporção volumétrica de biodiesel a qual terá uma combustão eficiente em motores de compressão. As principais propriedades de injeção e atomização relacionadas à qualidade de ignição do biodiesel foram mensuradas, como densidade, viscosidade e tensão superficial para diesel mineral (B0), biodiesel (B100) e outras onze misturas. Por meio do método proposto, foi verificado que misturas de diesel ao biodiesel etílico de óleo de soja de B2 a B30 apresentam uma combustão interna satisfatória.

Pereira et al. (2007) realizaram experimentos para geração de eletricidade usando misturas de diesel e biodiesel de óleo de soja produzido por processo de transesterificação usando metanol e KOH como catalisador. As propriedades (densidade, ponto de fulgor, viscosidade, ponto de fluidez, índice de cetano, corrosão, resíduo de carbono e conteúdo de cinza) dos combustíveis foram determinadas. A emissão dos gases de exaustão ( $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{C}_x\text{H}_y$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_x$  e  $\text{SO}_2$ ) também foi medida. Os resultados mostraram que para todas as misturas testadas a geração de eletricidade foi assegurada sem problema. Também foi observado que as emissões de  $\text{CO}$ ,  $\text{C}_x\text{H}_y$  e  $\text{SO}_2$  diminuíram no caso das misturas diesel-óleo de soja. As temperaturas dos gases de exaustão e as emissões de  $\text{NO}$  e  $\text{NO}_x$  foram similares ou menores que a do diesel.

## Histórico do biodiesel e dados de produção

Após a perfuração do primeiro poço de petróleo, em 27 de agosto de 1859, por Edwin Laurentine Drake, o mundo sofreu efetivamente um surto epidêmico de uso do petróleo, que de forma vertiginosa tem aumentado o consumo a milhões de barris diários, sendo que, concomitantemente, os impactos ambientais referentes à extração e uso desse combustível se elevaram em níveis alarmantes.

Muito antes de os temas relacionados à educação ambiental, aquecimento global e energias renováveis se tornarem manchetes de jornais, em 1900 Rudolph Diesel apresentou, na Exposição Mundial de Paris, um motor de ignição por compressão que funcionava com óleo de amendoim, ou seja, um biocombustível (Biodieselbr, 2011). Na Figura 27.1 está representado esse motor Diesel da primeira geração.

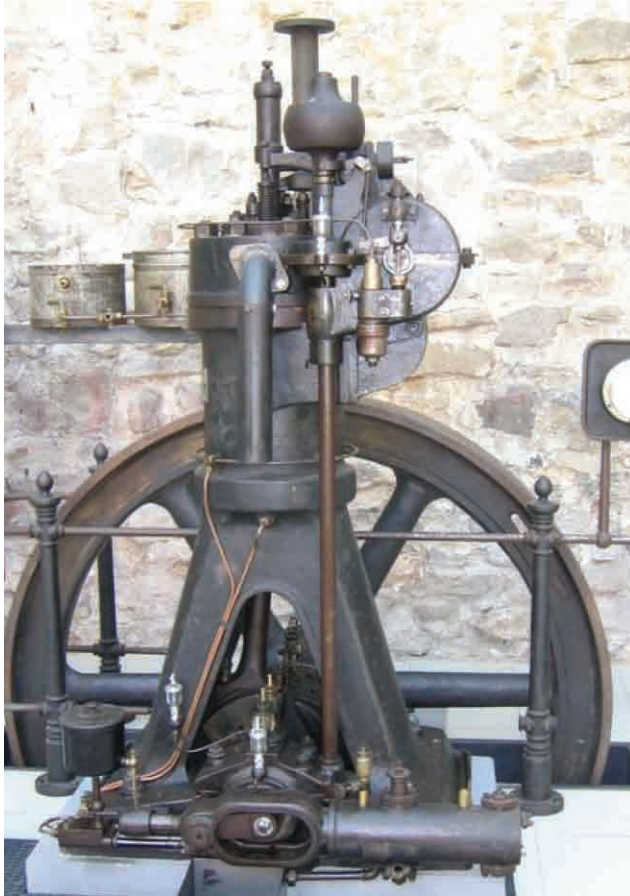


Figura 27.1 – Motor Diesel, primeira geração

Fonte: Peswiki (2011)

No livro escrito por Diesel, *Die Entstehung des Dieselmotors* (O surgimento das máquinas diesel), no último capítulo, intitulado Combustíveis Líquidos, a companhia Otto demonstrou o funcionamento de um pequeno motor diesel com bio-óleo de amendoim. Tal experiência foi tão bem-sucedida que apenas alguns dos presentes perceberam as circunstâncias em que a mesma havia sido conduzida. O motor, que havia sido construído para consumir petróleo, operou com óleo vegetal sem qualquer modificação. Também foi observado que o consumo de óleo vegetal resultou em um aproveitamento do calor literalmente idêntico ao do petróleo (Knothe; Van Gerpen; Krahl, 2006).



Durante uma apresentação no Instituto de Engenheiros Mecânicos da Grã-Bretanha em 1912, Diesel fez a seguinte afirmação: “o uso de óleos vegetais pode parecer insignificante hoje, mas tais óleos podem se tornar ao longo do tempo tão importantes quanto o petróleo e o carvão de hoje” (Biodieselbr, 2011).

O primeiro relato do que hoje é conhecido como biodiesel consta na patente belga 422.877, concedida em 31 de agosto de 1937 ao pesquisador Charles George Chavanne, denominada *Procédé de Transformation d'Huiles Végétales en Vue de Leur Utilisation comme Carburants* (Procedimento para a transformação de óleos vegetais para seu uso como combustíveis), que descreve a transesterificação do óleo de palma com metanol ou etanol na presença de ácido sulfúrico como catalisador (Dabdoub; Bronzel; Rampin, 2009).

Em 1942 foi publicado um relatório que descreve o que deve ter sido o primeiro teste de campo com um ônibus urbano movido a biodiesel. O ônibus foi abastecido com ésteres etílicos de palma e transportou passageiros em uma linha comercial entre as cidades de Bruxelas e Lovaina durante o verão de 1938 e o desempenho do ônibus foi relatado como satisfatório (Knothe; Gerpen; Krahl, 2006).

No Brasil, em 1980, o professor Expedito José Parente de Sá, da Universidade Federal do Ceará, solicitou a primeira patente de nível mundial para o processo de fabricação do biodiesel e do querosene vegetal de aviação (PI 8007957), com o título de *Processo de produção de combustíveis a partir de frutos ou sementes de oleaginosas*, a qual entrou em domínio público, pelo tempo e desuso (Parente, 2003).

A pesquisa sobre o uso do óleo de girassol transesterificado e refinado de acordo com os padrões do óleo diesel foi iniciada em 1979 na África do Sul, mais de um século após a descoberta da transesterificação de óleos vegetais. Em 1983, o processo para a produção de biodiesel com qualidade de combustível e os testes em motores foram completados e publicados internacionalmente. Uma empresa austríaca, chamada Gaskoks, obteve a tecnologia do grupo de Engenheiros Agrícolas Sul-Africanos e construiu a primeira planta piloto em novembro de 1987 e a primeira planta em escala industrial em abril de 1989, com capacidade de processamento para trinta mil toneladas de sementes de colza por ano.

## Cenário do biodiesel no mundo

O biodiesel surgiu mundialmente como uma alternativa próspera para a substituição dos combustíveis minerais, derivados do petróleo. Por ser renovável é uma fonte importante de energia que vêm sendo testada atualmente em vários países, como Brasil, Argentina, Estados Unidos, Malásia, Alemanha, França e Itália, os quais já produzem biodiesel comercialmente, estimulando o desenvolvimento em escala industrial (Biodieselbr, 2011).

O interesse mundial pelo biodiesel resulta em vários fatores, sendo um deles a redução da dependência do petróleo cujas maiores reservas estão em regiões politicamente críticas, como o Oriente Médio. Outro motivo está relacionado às questões ambientais, que levam a substituição de combustíveis fósseis por renováveis e menos poluentes. Em alguns países a plantação de oleaginosas para produção de biodiesel é considerada fonte de renda social e incentiva a fixação de populações no campo (Penteado; Cunha; Penteado, 2007).

Mundialmente adotou-se uma nomenclatura bastante apropriada para identificar a concentração do biodiesel na mistura com diesel de petróleo, sendo a mesma indicada por BXX, onde XX é a porcentagem em volume do biodiesel à mistura. Por exemplo, o B2, B5, B20 e B100 são combustíveis com uma concentração de 2, 5, 20 e 100%, respectivamente, de biodiesel ao diesel de petróleo (Meirelles, 2003 apud Silva, 2006).

O principal mercado produtor e consumidor de biodiesel em grande escala tem sido a Europa, pois as refinarias de petróleo naquele continente têm buscado a eliminação do enxofre do óleo diesel e, como a lubricidade desse óleo dessulfurado diminui muito, a correção tem sido feita com a adição do biodiesel, já que sua lubricidade é extremamente elevada (Shvoong, 2011).

De acordo com as metas do relatório Transporte 2050, apresentado pela Comissão Europeia, em Bruxelas, foi proposta a eliminação de todos os carros a diesel ou a gasolina das cidades do bloco até 2050 (BBC, 2011).

Segundo as estatísticas do Conselho Europeu de Biodiesel (*European Biodiesel Board* – EBB), a União Europeia produziu em 2009 cerca de 9,046 milhões de toneladas de biodiesel em mais de duzentas unidades localizadas, principalmente, na Alemanha, Itália, Áustria, França e Suécia.

Em 2009, a União Europeia liderou a produção mundial de biodiesel, representando 65% da produção mundial e cerca de 75% dos biocombustíveis produzidos na Europa, porém ainda continua longe de ser o principal

combustível produzido e comercializado na Europa. Atualmente, a capacidade de produção europeia de biodiesel é de aproximadamente 22 milhões de toneladas (EBB, 2010).

Os quatro maiores produtores de biodiesel na União Europeia são Alemanha, França, Espanha e Itália, que juntos representam quase 70% do biodiesel produzido na Europa. O Gráfico 27.6 representa a produção desses países entre os anos de 1998 e 2009.

A Alemanha é o maior produtor e consumidor de biodiesel do mundo, sendo responsável por quase 30% do biodiesel produzido na Europa e com capacidade de produzir 5 milhões de tonelada por ano (EBB, 2010).

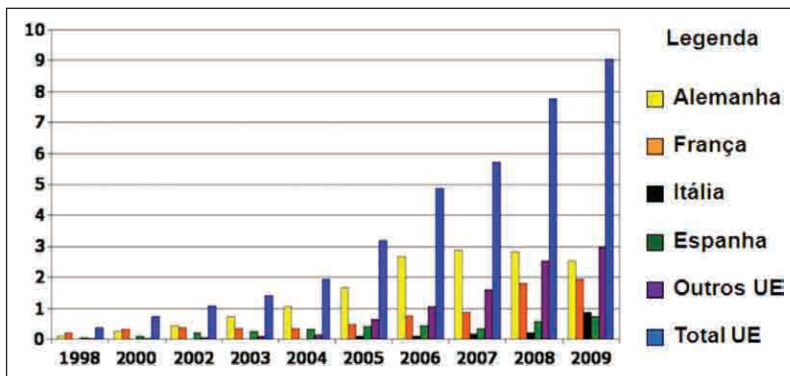


Gráfico 27.6 – Produção de biodiesel na UE entre 1998 e 2009 (em milhões de toneladas)

Fonte: Adaptado de EBB (2010)

A indústria de biodiesel nos Estados Unidos iniciou-se na década de 1990, por produtores de soja. Em 2010 existiam mais de 170 plantas de biodiesel com capacidade de produção estimada em 2,86 bilhões de litros, ou seja, cerca de 4,5% do consumo de diesel foi de biodiesel (*Thinking Ahead*, 2011).

O Gráfico 27.7 representa a produção estimada de biodiesel nos Estados Unidos em milhões de litros, entre os anos de 2005 e 2009, de acordo com o Conselho Nacional de Biodiesel (*National Biodiesel Board – NBB*).

Existe também um programa voluntário, denominado BQ-9000, que é coordenado pela NBB e que combina as especificações da ASTM para o biodiesel (ASTM D-6751) com um sistema de controle de qualidade que inclui estocagem, testes, mistura, embarque, distribuição e práticas de manejo de combustíveis.

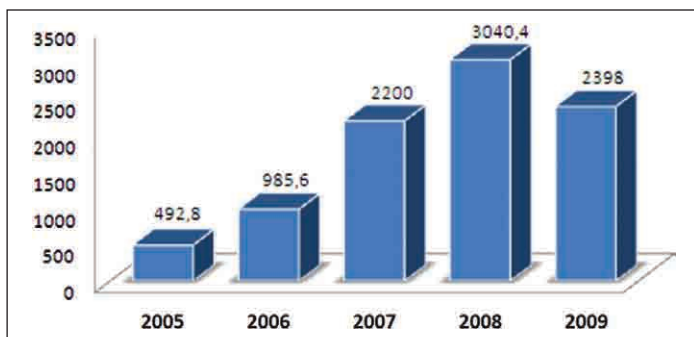


Gráfico 27.7 – Produção de biodiesel nos EUA entre 2005 e 2009 (em milhões de litros)

Fonte: Adaptado de NBB (2011)

Para que seja possível a exportação do biodiesel, é necessário transformá-lo em uma *commodity*, tendo como primeiro passo a padronização do produto de modo a criar um tipo de biodiesel que se torne referência internacional.

A dificuldade para transformar o biodiesel em uma *commodity* no mercado mundial é devida, principalmente, a dois fatores: restrições quanto às especificações físico-químicas do bicomcombustível e pressões internas da União Europeia e Estados Unidos para proteção da agricultura local (Prates et al., 2007 apud Ribeiro; Peixoto; Souza, 2008).

Para abrir os mercados mundiais ao biodiesel, será necessária uma habilidade de diplomacia destes países para negociar reduções na barreira comercial. Além disso, Estados Unidos e União Europeia pretendem aumentar o consumo de biocombustíveis de modo a reduzir a dependência em relação a fornecedores de petróleo instáveis, como países do Oriente Médio e Venezuela, por exemplo (Clemente et al., 2007 apud Ribeiro; Peixoto; Souza, 2008).

## Cenário do biodiesel no Brasil

No Brasil, a trajetória do biodiesel começou a ser delineada com as iniciativas de estudos pelo Instituto Nacional de Tecnologia na década de 20 (Sebrae, 2009).

Na década de 1970, a Universidade Federal do Ceará desenvolveu pesquisas com o intuito de encontrar fontes alternativas de energia. As

experiências acabaram por revelar um novo combustível originário de óleos vegetais e com propriedades semelhantes ao óleo diesel convencional, o biodiesel (Holanda, 2004 apud Quessada, 2008).

A primeira crise mundial do petróleo em 1973 motivou o governo brasileiro a desenvolver um Programa Nacional do Álcool Combustível (Pró-Álcool), a partir da sacarose extraída dos colmos da cana-de-açúcar. Paralelamente a este programa foi proposto, em 1975, o lançamento do Pró-Óleo – Plano de Produção de Óleos Vegetais para fins energéticos (Câmara, 2006), com o objetivo de gerar um excedente de óleo vegetal capaz de torná-lo competitivo com o óleo diesel de petróleo, sendo prevista inicialmente uma mistura de 30% de óleo vegetal no óleo diesel, com perspectiva para sua substituição integral a longo prazo (Biodieselbr, 2011).

Em 6 de dezembro de 2004, o governo federal lançou o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), com o objetivo de pôr em prática, de modo sustentável, técnico e econômico, a produção e o uso do biodiesel no Brasil, com destaque na inclusão social e no desenvolvimento regional, por meio de geração de emprego e de renda (Limiro, 2007).

Após amplas discussões no Congresso Nacional, foi aprovado o marco legal do biodiesel, composto pela Lei n.11.097, de 13 de janeiro de 2005, pela Lei n.11.116, de 18 de maio de 2005 e pelo Decreto n.5.297, de 6 de dezembro de 2004 (Lima, 2007).

A Lei n.11.097, de 13 de janeiro de 2005, ou Lei Biodiesel, estabelece os percentuais mínimos de mistura de biodiesel ao diesel de petróleo e o respectivo monitoramento do novo combustível no mercado nacional (Câmara, 2006). A Figura 27.2 apresenta o cronograma inicial do PNPB.

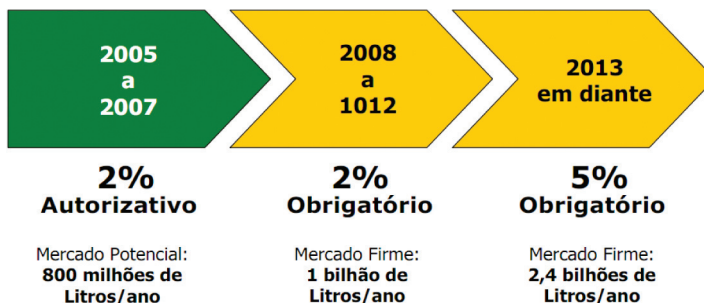


Figura 27.2 – Cronograma inicial do PNPB

Fonte: PNPB (2011)

Conforme representado na Figura 27.2, de 2005 a 2007 foi autorizada a mistura de 2% de biodiesel ao diesel, prevendo-se um mercado consumidor de oitocentos milhões de litros por ano; de 2008 a 2012 seria obrigatória a mistura de 2%, havendo uma previsão de um bilhão de litros ao ano.

A meta do PNPB de misturar 5% de biodiesel ao diesel foi antecipada em três anos, pois a partir de janeiro de 2010 o B5 começou a ser usado. Para tanto, foi necessária uma produção de aproximadamente 2,4 bilhões de litros (Zimmerman, 2010).

O Decreto n.5.297 criou o selo Combustível Social, concedido ao produtor de biodiesel para promover a inclusão social dos agricultores familiares enquadrados no Programa Nacional de Fortalecimento Familiar (Pronaf), que lhe forneçam matéria-prima e que comprovem regularidade perante o Sistema Integrado de Cadastro de Fornecedores (Sicaf) (Lima, 2007).

A empresa que possuir o selo poderá ter seus projetos financiados com condições especiais, conforme enquadramento a ser concedido pelo Ministério do Desenvolvimento Agrário, podendo contar, também, com benefícios tributários, como a redução de alíquotas de PIS/Pasep e Cofins e a possibilidade de participação nos leilões de aquisição de biodiesel pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (Sebrae, 2009).

A adição de biodiesel ao diesel de petróleo, ainda que parcial, proporcionará ao Brasil a redução das emissões de gases do efeito estufa, que será revertida em créditos de carbono e dará origem aos Certificados de Emissões Reduzidas (CERs), os quais serão comercializados no mercado internacional com os países industrializados que necessitam desses créditos para cumprir suas metas junto ao Protocolo de Kyoto (Limiro, 2007).

De acordo os dados do Boletim Mensal de Biodiesel de abril de 2011 da ANP, o Brasil possui 69 plantas produtoras em operação, correspondendo a uma capacidade autorizada de 17.415,95 m<sup>3</sup>/dia, sendo que 61 delas possuem autorização para comercialização do biodiesel produzido, correspondendo a 16.977,25 m<sup>3</sup>/dia de capacidade.

Dados preliminares, com base nas entregas dos leilões promovidos pela ANP e de estoques existentes, mostram que a produção em março de 2011 alcançou cerca de 232 mil m<sup>3</sup> e a produção acumulada no ano atingiu 586 milhões de litros, o que representa um aumento de 9% em relação ao mes-

mo período de 2010, que foi de 540 mil m<sup>3</sup>, conforme pode-se observar no Gráfico 27.8.

A entrada do biodiesel na matriz energética brasileira é de significativa importância ambiental, social e econômica, além de configurar um curso histórico no Brasil de investimentos em energias mais limpas, como o álcool e as hidrelétricas.

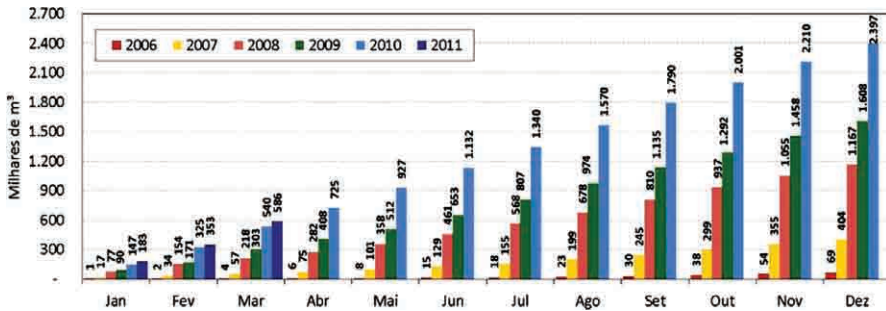


Gráfico 27.8 – Produção acumulada de biodiesel no período de 2006 a 2011

Fonte: MME (2011)

O biodiesel reduz de forma drástica a emissão de gases poluentes contribuindo em benefícios imediatos, principalmente nos grandes centros urbanos. Vários estudos científicos realizados pela União Europeia indicam que o uso de 1 kg de biodiesel colabora para a redução de 3 kg de CO<sub>2</sub>, um dos gases que provocam o efeito estufa (EBB, 2011).

Do ponto de vista social e econômico possibilita melhor aproveitamento da agricultura com aumento da renda do agronegócio tanto para os produtores de pequeno porte (agricultura familiar) quanto para os grandes empreendimentos, particularmente nos processos agroindustriais articulados com pequenos empreendimentos, além de promover significativa economia de divisas para o país (Sebrae, 2009).

Outro aspecto de importância no processo de realização do segmento do biodiesel diz respeito à sua regionalização, que pode promover o desenvolvimento socioeconômico pela oferta de empregos com aumento da renda local, principalmente no Nordeste.

O Brasil possui natural vocação para a agropecuária, apresentando condições de clima e de solo que permitem o cultivo de grande variedade de

oleaginosas, além de apresentar grandes rebanhos de suínos e bovinos, fontes de matéria-prima para o biodiesel.

Sob o olhar do potencial de geração de emprego e renda, além da produção de matéria-prima, deve-se ter em conta as oportunidades que emergem ao longo da cadeia de fornecimento para o campo, assim como para o complexo industrial.

No aspecto de projetos e empreendimentos rurais e industriais é essencial avaliar a viabilidade econômica, considerando o volume mínimo de produção; a assistência técnica; os fornecedores de equipamentos e serviços; as distâncias da produção agrícola em relação às respectivas unidades de processamento (usinas); a viabilidade logística e custos correspondentes; a disponibilidade de recursos financeiros para os investimentos fixos e capital de giro; os limitantes tecnológicos; as condições de clima; o solo e a adaptação das espécies no caso de cultivo de oleaginosas, com a atenção para o zoneamento agrícola que, além de indicar os locais mais adequados para o cultivo, favorece a obtenção de financiamentos da área agrícola (ibidem).

Os números mostram as perspectivas de crescente investimento no país para produção de biodiesel, sendo essa também uma tendência mundial. Os principais desafios estão ligados ao fato de ser um mercado nascente com um complexo agroindustrial em implantação. Fatores de toda ordem são de igual importância, como disponibilidade de recursos para investimentos fixos e custeio da produção agrícola, assistência técnica contínua que assegure produtividade e regularidade da produção e desenvolvimento de pesquisas de novas oleaginosas e de processos tecnológicos que minimizem custos de produção (ibidem).

## **Matérias-primas para a produção de biodiesel no Brasil**

O Brasil possui uma ampla diversidade de matérias-primas para a produção de biodiesel. Destacam-se entre elas as oleaginosas, como algodão, amendoim, dendê, girassol, mamona, pinhão manso e soja (ibidem).

A Tabela 27.1 apresenta a relação das espécies vegetais, produtividade e rendimento de acordo com as regiões produtoras.



Tabela 27.1 – Características de algumas culturas oleaginosas no Brasil

Espécie	Produtividade (toneladas/ha)	Porcentagem de óleo	Ciclo de vida	Regiões produtoras	Rendimento (ton óleo/ha)
Algodão	0,85 a 1,4	15	Anual	MT, GO, MS, BA e MA	0,1 a 0,2
Amendoim	1,5 a 2	40 a 43	Anual	SP	0,6 a 0,8
Dendê	15 a 25	20	Perene	BA e PA	3 a 6
Girassol	1,5 a 2	28 a 48	Anual	GO, MS, SP, RS e PR	0,5 a 0,9
Mamona	0,5 a 1,5	43 a 45	Anual	Nordeste	0,5 a 0,9
Pinhão manso	2 a 12	50 a 52	Perene	Nordeste e MG	1 a 6
Soja	2 a 3	17	Anual	MT, PR, RS, SP, GO, MS e MG	0,2 a 0,4

Fonte: Sebrae (2009)

A Figura 27.3 permite a visualização das regiões brasileiras com suas principais matérias-primas para a produção de biodiesel.



Figura 27.3 – Potencialidade brasileira para produção de oleaginosas

Fonte: Sebrae (2009)

Apesar da enorme variedade de oleaginosas existentes no Brasil para a produção de biodiesel, a soja sempre liderou a produção por ser uma cadeia produtiva bem estruturada. O Gráfico 27.9 representa as matérias-primas usadas na produção de biodiesel de julho de 2008 a fevereiro de 2011.

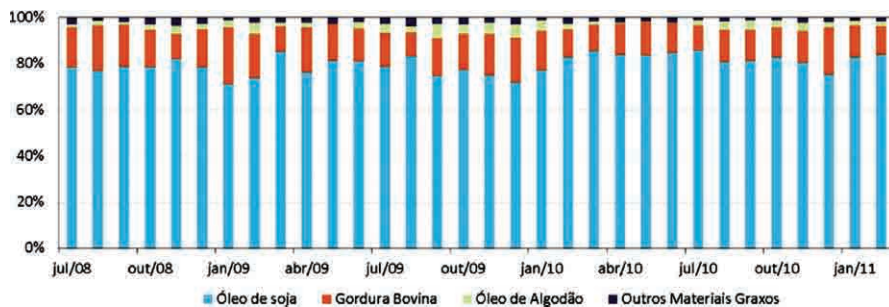


Gráfico 27.9 – Evolução da participação das matérias-primas usadas na produção de biodiesel  
Fonte: MME (2011)

Tendo como referência o mês de fevereiro de 2011, as matérias-primas com maior participação na produção de biodiesel foram o óleo de soja, seguida do sebo bovino e do óleo de algodão, conforme mostra o Gráfico 27.10.

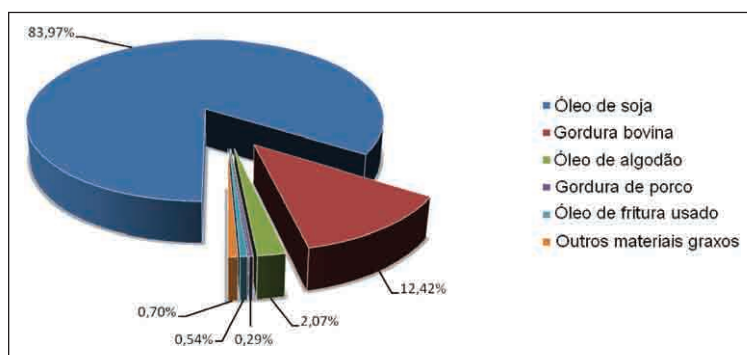


Gráfico 27.10 – Matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel em fevereiro de 2011  
Fonte: Adaptado de ANP (2011)

Todos os óleos vegetais, enquadrados na categoria de óleos fixos ou triglicéridicos, podem ser transformados em biodiesel. Dessa forma, poderiam constituir matéria-prima para a produção de biodiesel os óleos das

seguintes espécies vegetais: grão de amendoim, polpa do dendê, amêndoa do côco de dendê, amêndoa do coco da praia, caroço de algodão, amêndoa do côco de babaçu, semente de girassol, baga de mamona, semente de colza, semente de maracujá, polpa de abacate, caroço de oiticica, semente de linhaça e semente de tomate, entre muitos outros vegetais em forma de sementes, amêndoas ou polpas (Parente, 2003).

Os óleos e gorduras de animais possuem estruturas químicas semelhantes às dos óleos vegetais, sendo moléculas triglicéridicas de ácidos graxos. As diferenças estão nos tipos e distribuições dos ácidos graxos combinados com o glicerol (*ibidem*).

Os ácidos graxos predominantes em óleos e gorduras são:

- óleo de soja: ácido oleico;
- óleo de babaçu: ácido laurídico;
- sebo bovino: ácido esteárico.

Constituem-se exemplos de gorduras de animais, passíveis de serem transformados em biodiesel, o sebo bovino, os óleos de peixes, o óleo de mocotó e a banha de porco, entre outras matérias graxas de origem animal (*ibidem*).

Além dos óleos e gorduras virgens, constituem também matéria-prima para a produção de biodiesel os óleos e gorduras residuais, resultantes de processamentos domésticos, comerciais e industriais.

Segundo Parente (*ibidem*), as possíveis fontes dos óleos e gorduras residuais são:

- as lanchonetes e as cozinha industriais, comerciais e domésticas nas quais são praticadas as frituras de alimentos;
- as indústrias que processam frituras de produtos alimentícios, como amêndoas, tubérculos, salgadinhos e várias outras modalidades de petiscos;
- os esgotos municipais nos quais a nata sobrenadante é rica em matéria graxa, que torna possível a extração de óleos e gorduras;
- águas residuais de processos de certas indústrias alimentícias, como as indústrias de pescados, de couro etc.

Os óleos de frituras representam um potencial de oferta surpreendente, superando as mais otimistas expectativas. Tais óleos têm origem em deter-

minadas indústrias de produção de alimentos, nos restaurantes comerciais e institucionais e, ainda, nas lanchonetes (ibidem).

Todos os dias esses resíduos são descartados de forma errônea em pias, o que pode causar, além do entupimento dos encanamentos e filtros das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), o encarecimento do tratamento, e inclusive poluir e desoxigenar a água.

Também são surpreendentes os volumes ofertados de sebo de animais, especialmente de bovinos, nos países produtores de carnes e couros, como é o caso do Brasil. Tais matérias-primas são ofertadas, em quantidades substantivas, pelos curtumes e pelos abatedouros de animais de médio e grande porte (ibidem).

## **Aspectos dos processos produtivos de biodiesel**

O uso direto de óleos vegetais ou mistura de óleos vegetais com diesel é impraticável, principalmente pelo fato de os mesmos apresentarem alta viscosidade e altos índices de ácidos graxos livres (Ferrari et al., 2005; Carmargos, 2005 apud Quessada, 2008), que apresentam, com a combustão incompleta, formação de depósitos de carbono nos sistemas de injeção e formação de acroleína (substância altamente tóxica e cancerígena), resultante da decomposição térmica do glicerol (Torres, 2007 apud Quessada, 2008).

Vários métodos têm sido investigados para reduzir a alta viscosidade de óleos vegetais e, assim, permitir o seu uso em motores diesel sem problemas operacionais (Knothe; Van Gerpen; Krahl, 2006). Existem duas tecnologias que podem ser aplicadas para a obtenção de biodiesel a partir de óleos vegetais (puros ou de fritura) e sebo animal: a tecnologia de craqueamento e a tecnologia de transesterificação (Sebrae, 2009).

O craqueamento térmico ou pirólise é a conversão de uma substância em outra por meio do uso de calor, isto é, pelo aquecimento da substância na ausência de ar ou oxigênio a temperaturas que podem chegar a 450°C, a fim de provocar a quebra de moléculas. Dessa forma, há um gasto muito alto com energia térmica e, em algumas situações, esse processo é auxiliado por catalisadores, geralmente o óxido de silício e o óxido de alumínio, para quebrar as ligações químicas, de modo a gerar moléculas menores. O equi-

pamento para craqueamento térmico é caro, mas os produtos são similares quimicamente ao óleo diesel. A remoção de oxigênio reduz os benefícios de ser um combustível oxigenado, diminuindo seus ganhos ambientais e, geralmente, produzindo um combustível mais próximo da gasolina que do diesel (Caderno 55, 2007).

A transesterificação nada mais é do que a separação da glicerina do óleo vegetal, pois cerca de 20% de uma molécula de óleo vegetal é formada por glicerina, o que torna o óleo mais denso e viscoso. Durante o processo de transesterificação, a glicerina é removida do óleo vegetal, deixando o óleo mais fino e reduzindo a viscosidade (Biodieselbr, 2011).

A Figura 27.4 apresenta o esquema geral da reação de transesterificação, onde R é um radical orgânico relativo à cadeia de ácidos graxos. O álcool usado para a produção de biodiesel é usualmente o metanol ( $R' = \text{CH}_3$ ); todavia também pode ser usado o etanol ( $R' = \text{C}_2\text{H}_5$ ).

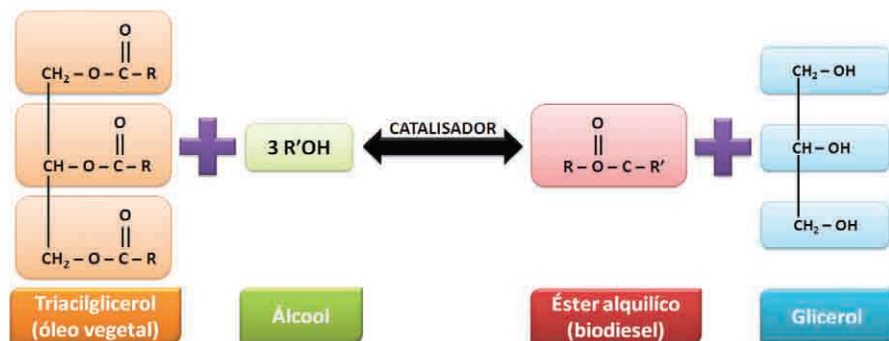


Figura 27.4 – Esquema geral da reação de transesterificação

Fonte: Adaptado de Knothe, Gerpen e Krahl (2006)

Quessada (2008) observa que a transesterificação com um álcool consiste em um número de reações consecutivas e reversíveis. Primeiramente, há a conversão de triglicerídeos em diglicerídeos; em seguida ocorre a conversão dos diglicerídeos em monoglicerídeos que, por sua vez, são convertidos em glicerol, liberando uma molécula de éster alquílico para cada etapa anterior, conforme representado na Figura 27.5.

O processo de produção de biodiesel por transesterificação, partindo de uma matéria graxa qualquer, envolve as etapas operacionais mostradas no fluxograma exposto na Figura 27.6.

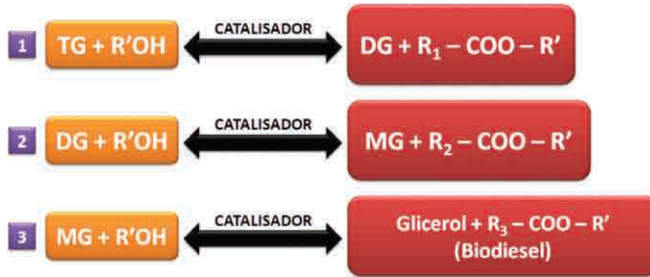


Figura 27.5 – Conversão de triglicerídeos e formação de glicerol e biodiesel

Fonte: Adaptado de Camargos (2005) apud Quessada (2008)

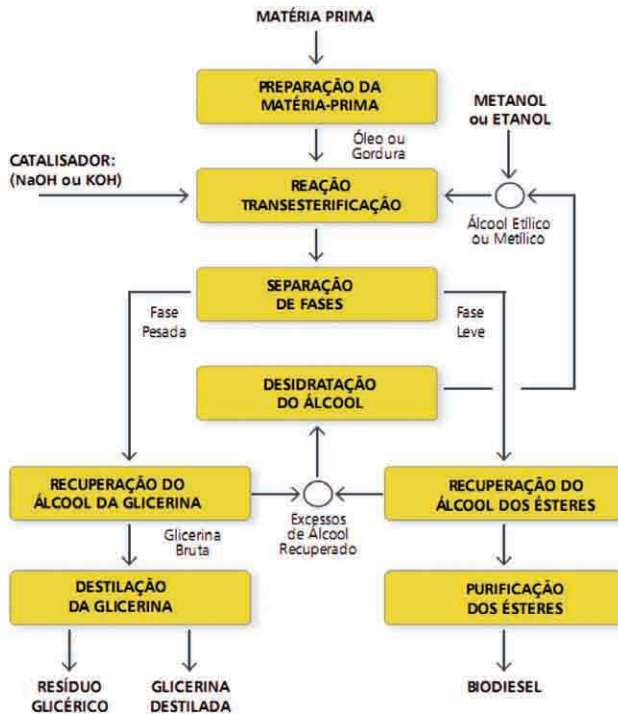


Figura 27.6 – Fluxograma do processo de produção de biodiesel

Fonte: Parente (2006) apud Sebrae (2009)

As variáveis mais importantes que afetam a produção do biodiesel por transesterificação incluem temperatura de reação taxa molar, tipo de catalisador, tempo de reação, presença de umidade e teor de ácidos graxos livres (Agarwal, 2007 apud Machado, 2008).

Os procedimentos referentes à preparação da matéria-prima para a sua conversão em biodiesel visam criar as melhores condições para a efetivação da reação de transesterificação, com a máxima taxa de conversão. A princípio é necessário que a matéria-prima tenha o mínimo de umidade e de acidez, o que é possível submetendo-a a um processo de neutralização, por meio de uma lavagem com uma solução alcalina de hidróxido de sódio (NaOH) ou de potássio (KOH), seguida de uma operação de secagem ou desumidificação. Essas especificações de tratamento dependem da natureza e das condições da matéria graxa empregada como matéria-prima.

A reação de transesterificação é a etapa da conversão, propriamente dita, do óleo ou gordura, em ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, que constituem o biodiesel. Essa reação é realizada em um reator provido de camisa de circulação de água aquecida e agitação mecânica. O sistema permanece a 50°C e então se adiciona o óleo neutro. Quando o sistema atinge 45°C, são adicionados a solução de metanol ou etanol e o catalisador (NaOH ou KOH), estabelecendo-se este momento como o tempo zero da reação. Também são comumente empregados outros compostos de caráter alcalino, como os metóxidos ou etóxidos de sódio e potássio (Khalil, 2006).

A Figura 27.7 mostra a reação da rota metílica e respectivas equações.

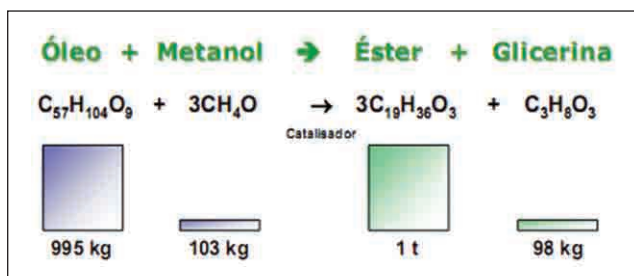


Figura 27.7 – Processo de produção de biodiesel com rota metílica

Fonte: PNPB (2011)

A Figura 27.7 representa a reação de conversão, quando se utiliza o metanol como agente de transesterificação, obtendo-se portanto como produtos os ésteres, que constituem o biodiesel e a glicerina.

Uma situação na qual o etanol é empregado pode ser vista na Figura 27.8.

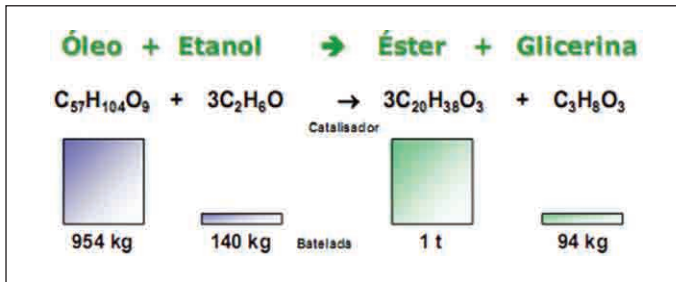


Figura 27.8 – Processo de produção de biodiesel por rota etílica

Fonte: PNPB (2011)

Uma polêmica permanente entre os especialistas em biodiesel durante a defesa das rotas tecnológicas metílicas e etílicas é a questão da relação consumo de álcool x rendimento em biodiesel. O consumo de metanol é cerca de 103 kg de álcool por 995 kg de óleo transesterificado, produzindo 1.000 kg de biodiesel, enquanto o rendimento do etanol é maior: 140 kg de álcool por 954 de óleo, produzindo 1.000 kg de biodiesel (Khalil, 2006).

A Tabela 27.2 apresenta as características mais importantes relativas à produção de ésteres, segundo as rotas com metanol e etanol.

Tabela 27.2 – Características das rotas de processo com o metanol e o etanol

Características	Metanol	Etanol
Origem	Petroquímica	Cana-de-açúcar
Oferta	Importado	Produto nacional
Fonte	Não renovável	Renovável
Volatilidade	Alta	Moderada
Chama	Invisível	Visível
Toxicidade	Elevada	Moderada
Custo	R\$ 700/ ton	R\$ 950/ ton
Cetano do éster	53	64
Tempo de reação	45 min	90 min
Investimentos	Baixo	Alto
Temperatura de reação	60°C	80°C

Fonte: Adaptado de PNPB (2011)



De acordo com Parente (2003), sob o ponto de vista técnico e econômico, a reação via metanol é muito mais vantajosa que a reação via etanol.

Ramos et al. (2003) apud Machado (2008), destacam que a importância de produzir ésteres etílicos pode ser relacionada aos seguintes fatos: ser um combustível biodegradável e não agressivo ao meio ambiente, e apresentar um potencial de redução de fuligem de 50%, podendo ser usado puro ou em misturas com o diesel de petróleo com alta lubrificidade, sem enxofre na composição.

Os ésteres etílicos podem ser utilizados imediatamente sem qualquer exigência quanto à tecnologia de motores, principalmente se utilizados em misturas. A produção de ésteres etílicos compõem um balanço de carbono em ciclo praticamente fechado, pois é obtido de produtos renováveis e pode ser utilizado como projeto de sequestro de carbono (Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL) apud Machado, 2008).

Após a reação de transesterificação que converte a matéria graxa em ésteres (biodiesel), a massa reacional final é constituída de duas fases, separáveis por decantação ou por centrifugação.

A fase mais pesada é composta de glicerina bruta, impregnada dos excessos utilizados de álcool, de água e de impurezas inerentes à matéria prima. A fase menos densa é constituída de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, conforme a natureza do álcool originalmente adotado, também impregnado de excessos reacionais de álcool e de impurezas.

De acordo com Knothe, Van Gerpen e Krahl (2006), mesmo após a reação de transesterificação virtualmente completa, pequenas quantidades de tri, di e monoacilgliceróis permanecem no produto final, reduzindo a qualidade do biodiesel produzido.

A separação de fases é uma etapa importante da produção de biodiesel. O processo de refino dos produtos decorrentes da sua produção pode ser tecnicamente difícil e pode elevar substancialmente os custos de produção. A pureza do biodiesel deve ser alta e de acordo com certas especificações. De acordo com a especificação da União Europeia, por exemplo, o teor de ácidos graxos livres, álcool, glicerina e água devem ser mínimos, de modo que a pureza do biodiesel seja superior a 96,5% (Biodieselbr, 2011).

Para realizar a recuperação do álcool da glicerina, a fase pesada, contendo água e álcool, é submetida a um processo de evaporação, eliminando

da glicerina bruta esses constituintes voláteis, cujos vapores são liquefeitos num condensador apropriado.

A etapa de recuperação do álcool dos ésteres é realizada da mesma forma, mas separadamente; o álcool residual é recuperado da fase mais leve, liberando para as etapas seguintes os ésteres metílicos ou etílicos.

Os excessos residuais de álcool, após os processos de recuperação, contêm quantidades significativas de água, necessitando de uma separação. A desidratação do álcool é feita normalmente por destilação.

No caso da desidratação do metanol, a destilação é bastante simples e fácil de ser conduzida, uma vez que a volatilidade relativa dos constituintes dessa mistura é muito grande e, ademais, inexistente o fenômeno da azeotropia, ou seja, quando a mistura de duas ou mais substâncias a uma certa composição possuem um ponto de ebulição constante e fixo, como se fosse uma substância pura, elas não podem ser separadas por processo de destilação simples.

Diferentemente, a desidratação do etanol é mais complicada devido à existência do fenômeno da azeotropia e a uma menor volatilidade relativa dos componentes da mistura etanol-água.

Para realizar a purificação dos ésteres, estes devem ser lavados por centrifugação e desumidificados posteriormente, resultando finalmente o biodiesel, o qual deverá ter suas características enquadradas nas especificações das normas técnicas estabelecidas para o biodiesel como combustível para uso em motores do ciclo diesel.

Por fim, é realizada a destilação da glicerina, pois a glicerina emergente do processo de produção de biodiesel possui muitas impurezas. Para o mercado é favorável a comercialização da glicerina purificada. A purificação da glicerina bruta é feita por destilação à vácuo, resultando um produto límpido e transparente, denominado comercialmente de glicerina destilada, que possui várias aplicações, principalmente na indústria química. Os mercados que mais crescem com seu consumo são o de uso pessoal e higiene dental e de alimentos e bebidas, que juntos respondem por cerca de 64% das aplicações da glicerina.

A glicerina pode ainda ser usada como um dos principais ingredientes na indústria farmacêutica na composição de cápsulas, analgésicos, xaropes etc. Outros mercados importantes são: cosméticos, têxteis, lubrificante de máquinas de processos alimentícios, fabricação de tintas e resinas, fabricação de dinamite etc. (Cadernos NAE, 2004).

## Propriedades físicas e químicas do biodiesel

A lei n.11.097 datada de 13 de janeiro de 2005 define o biodiesel como um “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores à combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”.

No Brasil, a especificação dos padrões de qualidade do biodiesel foi realizada segundo a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e normas internacionais como a American Society for Testing and Materials (ASTM), International Organization for Standardization (ISO) e Comité Européen de Normalisation (CEN), sendo as mesmas regulamentadas pela ANP em 2008. Várias propriedades físicas e químicas foram padronizadas, como massa específica, viscosidade cinemática, ponto de fulgor, teor de enxofre, número de cetano, teor de glicerina livre e total e teor de acilgliceróis, dentre outras.

A seguir serão descritas as principais propriedades físicas e químicas do biodiesel, pelas quais podem ser observadas suas vantagens e desvantagens em relação ao diesel convencional de acordo com Knothe, Van Gerpen e Krahl (2006) apud Dib (2010):

- *Viscosidade e densidade*: As propriedades fluidodinâmicas de um combustível, importantes no que diz respeito ao funcionamento de motores de injeção por compressão (motores diesel), são a viscosidade e a densidade. Tais propriedades exercem grande influência na circulação e injeção do combustível. Afortunadamente, as propriedades fluidodinâmicas do biodiesel, independentemente de sua origem, assemelham-se às do óleo diesel mineral, significando que, deste ponto de vista, não seja necessária qualquer adaptação ou regulagem no sistema de injeção dos motores.
- *Lubricidade*: A lubricidade é uma medida do poder de lubrificação de uma substância, sendo uma função de várias de suas propriedades físicas, destacando-se a viscosidade e a tensão superficial. Diferentemente dos motores movidos a gasolina, os motores a óleo diesel exigem que o combustível tenha propriedades de lubrificação, especialmente, em razão do funcionamento da bomba, exigindo que o líquido que escoar lubrifique adequadamente as suas peças em movimento.

- *Ponto de névoa e de fluidez*: O ponto de névoa é a temperatura em que o líquido, por refrigeração, começa a ficar turvo, e o ponto de fluidez é a temperatura em que o líquido não mais escoava livremente. Tanto o ponto de fluidez quanto o ponto de névoa do biodiesel variam segundo a matéria-prima que lhes deu origem, e ainda segundo o álcool utilizado na reação de transesterificação. Estas propriedades são consideradas importantes no que diz respeito à temperatura do ambiente onde o combustível deva ser armazenado e utilizado. Todavia, no Brasil, de norte a sul, as temperaturas não apresentam nenhum problema de congelamento do combustível, sobretudo porque se pretende usar o biodiesel em mistura com o óleo diesel mineral.
- *Ponto de fulgor*: É a temperatura em que um líquido torna-se inflamável em presença de uma chama ou faísca. Esta propriedade somente assume importância no que diz respeito à segurança nos transportes, manuseios e armazenamentos. O ponto de fulgor do biodiesel, se completamente isento de metanol ou etanol, é superior à temperatura ambiente, significando que o combustível não é inflamável nas condições normais em que ele é transportado, manuseado e armazenado, servindo inclusive para ser utilizado em embarcações.
- *Poder calorífico*: O poder calorífico de um combustível indica a quantidade de energia desenvolvida pelo combustível por unidade de massa, quando ele é queimado. O poder calorífico do biodiesel é muito próximo do poder calorífico do óleo diesel mineral. A diferença média em favor do óleo diesel do petróleo situa-se na ordem de somente 5%. Entretanto, com uma combustão mais completa, o biodiesel possui um consumo específico equivalente ao diesel mineral.
- *Índice de cetano*: O índice de octano ou octanagem dos combustíveis está para motores do ciclo Otto da mesma forma que o índice de cetano ou cetanagem está para os motores do ciclo Diesel. Portanto, quanto maior for o índice de cetano de um combustível, melhor será a combustão desse combustível num motor diesel. O índice de cetano médio do biodiesel é 60, enquanto para o óleo diesel mineral a cetanagem situa-se entre 48 a 52, bastante menor, sendo esta a razão pela qual o biodiesel apresenta uma ignição mais controlada e queima melhor no motor do que o próprio óleo diesel mineral.

Dentre as propriedades químicas do biodiesel podem ser destacadas as seguintes:

- *Teor de enxofre*: Como os óleos vegetais e as gorduras de animais não possuem enxofre, o biodiesel é completamente isento desse elemento. Os produtos derivados do enxofre são bastante danosos ao meio ambiente (os  $\text{SO}_x$  são responsáveis pela chuva ácida), ao motor e seus componentes. Depreende-se que o biodiesel é um combustível limpo, enquanto o diesel mineral, possuindo baixo teor de enxofre, danifica a flora, a fauna, o homem e o motor.
- *Teor de óxidos nítricos (NOx)*: Em relação ao diesel convencional, o biodiesel apresenta um aumento nas emissões de NOx. Um dos fatores relacionados a este aumento pode ser atribuída à matéria-prima ou à formulação empregada para produção do biodiesel.
- *Poder de solvência*: O biodiesel, sendo constituído por uma mistura de ésteres de ácidos carboxílicos, solubiliza um grupo muito grande de substâncias orgânicas, incluindo-se as resinas que compõem as tintas. Dessa forma, cuidados especiais com o manuseio do biodiesel devem ser tomados para evitar danos à pintura dos veículos, nas proximidades do ponto ou bocal de abastecimento.
- *Biodegradabilidade e toxicidade*: O biodiesel mostrou-se altamente biodegradável em uma simulação de derramamento no solo. Um solo contaminado com biodiesel pode promover a germinação de sementes após a biodegradação do óleo que ocorreu de 4 a 6 semanas. Porém, durante o processo de biodegradação, houve um rápido crescimento de microorganismos que de alguma forma prejudicaram o crescimento do vegetal neste solo. Quanto ao fato de ser tóxico, foram feitos estudos em ratos para analisar os malefícios causados ao ingerir o biodiesel e comparados aos efeitos do diesel mineral: o biodiesel também apresenta menos toxicidade, fato este que foi relacionada a uma quantidade inferior observada de óbitos dos animais.
- *Estabilidade oxidativa*: O biodiesel é susceptível à oxidação quando exposto ao ar. Esta propriedade pode ser associada à existência das ligações insaturadas nas cadeias carbônicas provenientes dos ácidos graxos, fato que pode comprometer a armazenagem e o uso do bio-

combustível, porém pode ser superada pela utilização de aditivos que melhoram a conservação do biodiesel.

Hoje existem diversas especificações do biodiesel aceitas no Brasil: a americana, a europeia e a brasileira, conforme representado na Tabela 27.3 (Ribeiro; Peixoto; Souza, 2008).

Tabela 27.3 – Limites para certificação/especificação do biodiesel

Características	Unid.	Limite	Método		
			ABNT	ASTM	EN / ISO
Aspecto	–	L II	–	–	–
Massa específica a 20°C	kg/m <sup>3</sup>	850 – 900	7148/14065	1298/4052	3675/12185
Viscosidade cinemática a 40°C	mm <sup>2</sup> /s	3,0 - 6,0	10441	445	3104
Teor de água, máx.	mg/kg	500	–	6304	12937
Contaminação total, máx.	mg/kg	24	–	–	12662
Ponto de fulgor, mín.	°C	100,0	14598	93	3679
Teor de éster, mín.	% massa	96,5	15342	–	14103
Resíduo de carbono	% massa	0,050	–	4530	–
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	50	–	5453	20846/20884
Sódio + potássio, máx.	mg/kg	5	15554/15555 15553/15556	–	14108/14109 14538
Cálcio + magnésio, máx.	mg/kg	5	15553/15556	–	14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	14107
Corrosividade ao Cu, 3h a 50°C, máx.	–	1	14359	130	2160
Número de cetano	–	Anotar	–	613/6890	5165
Ponto entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19	14747	6371	116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	14104
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341	6584	14105/14106
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344	6584	14105
Mono, di, triacilglicerol	% massa	Anotar	15342/15344	6584	14105
Metanol ou etanol, máx.	% massa	0,20	15343	–	–
Índice de iodo	g/100g	Anotar	–	–	14111
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.	h	6	–	–	14112

Fonte: Adaptado de ANP (2008) apud Dib (2010)

## Patentes sobre biodiesel

Conforme supracitado, o desenvolvimento do biodiesel tem apresentado ótimos frutos para o todos os setores ligados à produção desse combustível. Todavia, para que se tenha um crescimento sólido e o Brasil consiga consolidar o setor de biodiesel com confiança perante o mercado consumidor e até tornar este uma *commodity*, será necessário investir de forma intensificada em pesquisas.

De acordo com o Boletim Mensal de Combustíveis Renováveis do MME de março de 2011, a Comissão Econômica para a América Latina e o Caribe (Cepal) publicou o estudo *Análisis comparativo de patentes en la cadena de producción de biocombustibles entre América Latina y el resto del mundo*.

No estudo, a Cepal realizou um levantamento sobre o número de patentes em biocombustíveis a fim de identificar quais países estão na vanguarda do desenvolvimento tecnológico no setor de biocombustíveis.

Foram identificadas 846 patentes relativas à produção de etanol. A China é o país com o maior número de patentes de propriedades de indivíduos ou entidades nacionais.

O Brasil ocupa o 13º lugar, com dez patentes, conforme representado no Gráfico 27.11.

O estudo considerou o número de patentes registradas como um indicador que permite a obtenção de uma imagem da evolução de cada país na geração de inovação e levou em conta tecnologias de obtenção das principais matérias-primas, produtos intermediários e produtos finais relativos a biocombustíveis.

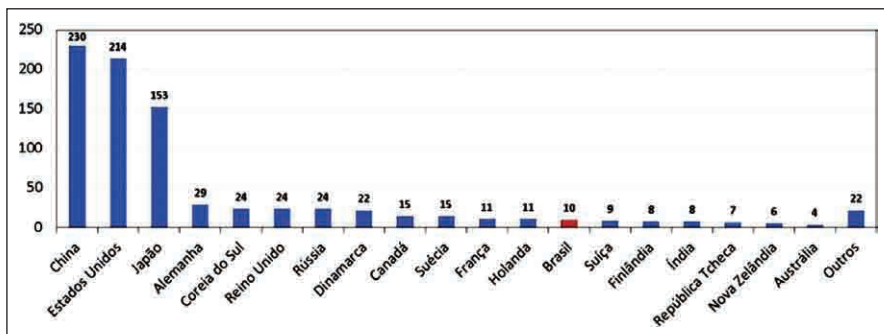


Gráfico 27.11 – Número de patentes na produção de etanol de 2006 a 2010

Fonte: MME (2011)

Com relação ao biodiesel, o estudo da Cepal identificou 602 patentes e, novamente, a China apareceu com o maior número de patentes.

O Brasil ocupa o 6º lugar, com 16 patentes, conforme representado no Gráfico 27.12.

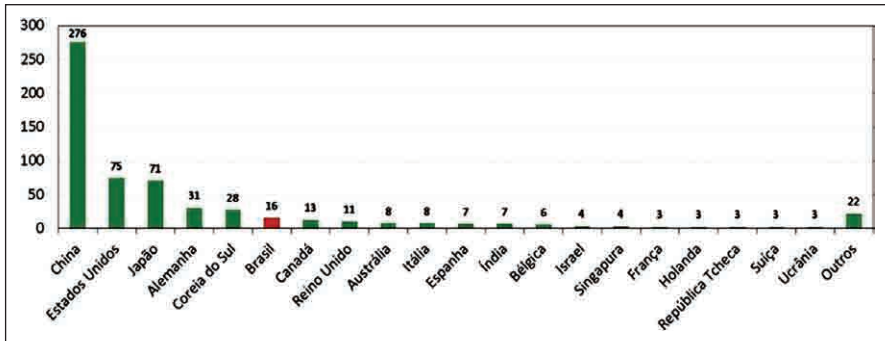


Gráfico 27.12 – Número de patentes na produção de biodiesel de 2006 a 2010

Fonte: MME (2011)

De acordo com as linhas de pesquisa, definidas de acordo com a Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel (Biodiesel, 2007 apud Ribeiro; Peixoto; Souza, 2008), são definidas separadamente, para que se entendam melhor cada uma delas:

- *Agricultura*: refere-se a invenções relacionadas com variedades vegetais e oleaginosas, economia e modelagem de sistemas, e processamento e transformação.
- *Armazenamento*: refere-se a invenções relacionadas com critérios e formas de armazenamento do biodiesel e de suas misturas envolvendo biodiesel e diesel, bem como o desenvolvimento de aditivos, de modo a alcançar as condições ideais de condicionamento do combustível.
- *Caracterização e controle da qualidade (CCQ)*: refere-se a invenções relacionadas com a caracterização de óleo *in natura*, do combustível e suas misturas (biodiesel e diesel), provenientes de diversas matérias-primas, com análise da qualidade segundo critérios e normas estabelecidos, visando a maior praticidade e economicidade.
- *Coprodutos*: refere-se a invenções relacionadas com o destino e o uso dos coprodutos, como glicerina, torta, farelo etc., para garantir a agregação de valor e a geração de outras fontes de renda para os seus produtores.



- *Produção*: refere-se a invenções de tecnologias para produção de biodiesel tanto em laboratório quanto em escalas adequadas às produções locais de óleo visando garantir a qualidade e economicidade das plantas.

O Gráfico 27.13 revela que 62, do total de cem documentos de patente analisados, reivindicam a produção de biodiesel para patentes.

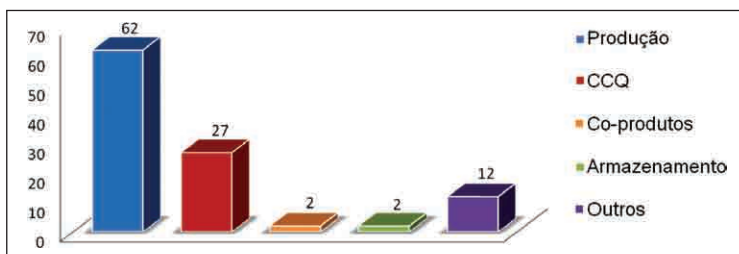


Gráfico 27.13 – Número de documentos de patente por linhas de pesquisa

Fonte: Adaptado de Espacenet (2008) apud Ribeiro, Peixoto e Souza (2008)

A inclusão deste tópico no presente capítulo é para mostrar que, embora o Brasil tenha um grande potencial em termos de produção de biodiesel, ainda é pequeno o número de patentes nesta área, e diante desse contexto, a Unesp de Ilha Solteira tem realizado pesquisas relacionadas ao desenvolvimento e/ou otimização de tecnologias para a produção de biodiesel com a construção de uma miniusina de baixo custo para produção de biodiesel e instrumentos de controle de processos, as quais serão apresentadas posteriormente e que poderão resultar em pedidos de patentes.

## Pesquisas na área de biodiesel realizadas no âmbito do Nuplen

O Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen) do Departamento de Engenharia Mecânica da Unesp de Ilha Solteira tem desenvolvido diversos estudos relacionados à produção de biodiesel, caracterização e realização de testes em motores de combustão interna automotivos e estacionários, bem como no desenvolvimento de equipamentos e acessórios envolvidos no processo produtivo, sendo os mais importantes deles destacados a seguir.

## Pesquisas sobre produção de biodiesel

### Procedimentos básicos para produção de biodiesel

Os procedimentos básicos de produção do biodiesel, que podem ser aplicados tanto em nível laboratorial quanto na produção em maior escala, levam em conta o pré-tratamento da matéria-prima, titulação e transesterificação alcalina.

De acordo com Van Gerpen et al. (2004), o pré-tratamento da matéria-prima a ser utilizada na produção do biodiesel envolve os procedimentos de verificação da umidade, secagem e/ou filtragem do óleo, assim como a devida análise de ácidos graxos livres (AGL), que no caso de ser maior que 2%, o óleo deverá passar pelo processo de esterificação, no qual será adicionado 2,25 g de metanol, juntamente com 0,05 g de ácido sulfúrico para 1 g de AGL.

A quantidade de catalisador é uma importante variável na fabricação do biodiesel. A quantidade mínima recomendada no processo é de 4 g de hidróxido de sódio para cada litro de óleo da matéria-prima. O catalisador adicional determina-se mediante a titulação do óleo. O indicador para o titulado é uma solução de 1% de fenolftaleína em álcool etílico. São 10 gotas por titulação.

A fenolftaleína é usada para mostrar uma mudança no pH do óleo. Quando o pH for neutro a fenolftaleína será incolor. Para que o pH se torne básico deve-se adicionar hidróxido de sódio e a cor mudará para rosa claro. Dessa forma, pode se determinar quanto catalisador será necessário para que o óleo passe de ácido para ligeiramente básico, correspondendo a uma cor rosa claro.

Para titulação, prepara-se uma solução de hidróxido de sódio a 1/1000 em água destilada. Isso se faz dissolvendo 1 g de hidróxido de sódio em 1 litro de água destilada, que deve ser agitada até se obter uma mistura homogênea com o óleo vegetal dissolvido no álcool.

A esta solução (óleo + álcool isopropílico) adicionam-se 10 gotas da solução de fenolftaleína a 1% em álcool etílico, agitando até se conseguir uma mistura homogênea. Se o resultado for uma cor rosa claro e se esta cor permanecer por mais de 10 segundos após a agitação, a titulação está terminada. Tal mudança de cor indica que a amostra de óleo/álcool isopropílico não está ácida e tem um pH ligeiramente acima de 7. Se a solução óleo/álcool isopropílico/fenolftaleína não mudar de cor, continua-se com

a titulação. Para isso, adiciona-se à solução de óleo/álcool isopropílico/fenolftaleína mais 1 cm<sup>3</sup> da solução hidróxido de sódio/água destilada. Agitar novamente a mistura. Se se obtiver uma cor rosa claro por mais de 10 segundos, a titulação está terminada. Caso contrário, adiciona-se mais 1 cm<sup>3</sup> de hidróxido de sódio/água destilada.

Devem-se adicionar as quantidades de hidróxido de sódio/água destilada até que se observe o tom rosa claro por mais de 10 segundos. Ao final do processo são somadas estas quantidades, pois estas serão equivalentes a 1 g de hidróxido de sódio por litro de óleo da matéria-prima que deverá ser adicionada, além da quantidade mínima de catalisador, para obter um processamento correto do óleo que foi titulado.

Para realizar a transesterificação alcalina é necessário adicionar uma quantidade de metanol igual a 20% do volume de matéria-prima não transesterificada e 4 g de NaOH para cada litro de óleo à quantidade adicional de catalisador para correção da acidez remanescente do pré-tratamento, sendo que a solução de NaOH, deve ser misturada com a matéria-prima que se encontra entre 55 e 65°C.

Em seguida deve-se agitar a mistura simultaneamente com o aumento da temperatura até que a mesma atinja 90°C, e continuar a agitação por mais 15 ou 20 minutos, após desligado o aquecimento. Por conseguinte, a mistura deve ficar em repouso durante 6 a 8 horas para que as fases de biodiesel e glicerina se separem por decantação. Esta etapa pode ser acelerada por meio da centrifugação dos produtos.

Após separar completamente as fases, o biodiesel deve ser submetido a uma filtração em resina, a fim de neutralizar os hidróxidos remanescentes, e, por fim, tem-se a lavagem do biodiesel, que necessita de uma evaporação a vácuo a fim de evitar que ocorra a hidrólise do biodiesel produzido (Van Gerpen et al., 2004).

### **Produção de biodiesel em laboratório, usando óleo de soja degomado e de fritura reciclado**

A produção de biodiesel em laboratório com óleo de soja degomado e óleo de soja de fritura teve como objetivo assistir aos fenômenos decorrentes do processo de transesterificação, utilizando-se, para tanto, um agitador magnético para simular o funcionamento de um reator, o qual será utilizado depois para a produção de biodiesel em maior escala (Dib, 2010).

A Figura 27.9 representa a bancada usada no laboratório para a realização dos testes das amostras de matérias-primas.

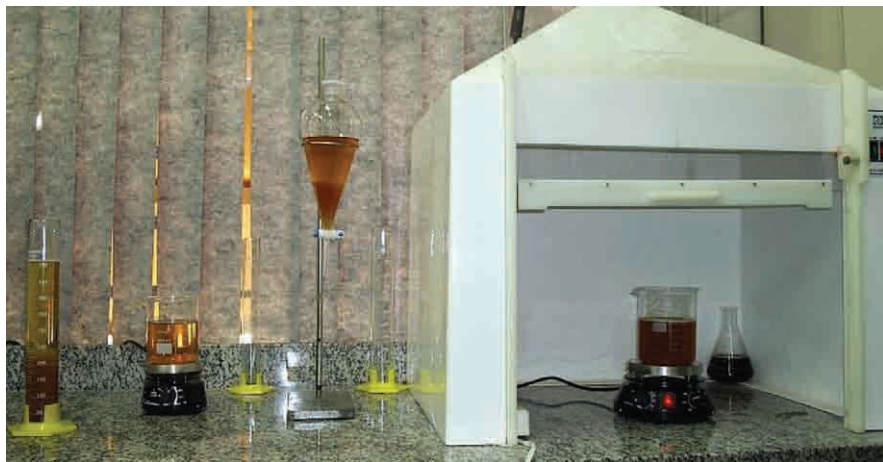


Figura 27.9 – Bancada de laboratório para a realização dos processos de obtenção do biodiesel

Fonte: Dib (2010)

Na Tabela 27.4 são apresentados os teores de ácidos graxos livres presentes nas matérias-primas.

Tabela 27.4 – Teor de ácidos graxos livres presentes nos óleos

Matéria-Prima	Densidade (g/ml)	Teor de AGL (%)	Tratamento
Óleo de soja	0,926	< 1,0	Não
Óleo de fritura usado	0,898	2,0 – 3,0	Sim

Fonte: Dib (2010)

Primeiramente, utilizou-se o óleo de soja degomado e rota metílica com o hidróxido de sódio como catalisador, sendo que o teor de ácidos graxos presentes nesse óleo permitiu que a matéria-prima fosse submetida diretamente ao processo de transesterificação alcalina.

Foram aquecidos 500 ml de óleo a uma faixa de temperatura entre 55 e 65°C, antes de se adicionar a ele uma solução formada por 2 g de NaOH P.A. em 100 ml de metanol anidro, mostrada na Figura 27.10.



Figura 27.10 – Processo de formação do metóxido de sódio

Fonte: Dib (2010)

Após a mistura, a reação foi conduzida à temperatura de entrada do óleo, com o recipiente fechado para evitar a evaporação prematura do metanol, durante um período aproximado de uma hora. Após 45 minutos, foi possível observar a mudança de cor do conteúdo em agitação, de “amarelo translúcido” para um tom “escuro e transparente” (ibidem). Na Figura 27.11, pode ser observado o comportamento da amostra durante a reação de transesterificação.



(a) Início



(b) Término

Figura 27.11 – Processo de transesterificação do óleo de soja degomado com metóxido de sódio

Fonte: Dib (2010)

De acordo com Dib (ibidem), este fenômeno é semelhante ao que foi observado por Ferrari (2005) e, por analogia, este pode ter sido o início de que todos os triglicerídeos também tenham sido convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos finalizando, assim, a reação de transesterificação. A amostra transesterificada foi colocada em um funil de separação, onde permaneceu em decantação por um período de 12 horas. A Figura 27.12 mostra as fases de biodiesel e glicerol formados ao final do período da decantação.



Figura 27.12 – Processo de decantação do óleo de soja degomado com metóxido de sódio  
Fonte: Dib (2010)

O conteúdo do funil de decantação foi drenado até a remoção completa do glicerol e, em seguida, o biodiesel remanescente foi submetido ao processo de filtração por meio de uma resina de troca iônica (*Amberlite™ BD10DRY™* da *Rohm and Haas*), para neutralização do catalisador básico. Os volumes obtidos de biodiesel e glicerol podem ser observados na Figura 27.13.

Para cada 500 ml de óleo de soja reagidos com 100 ml de metanol foram obtidos 460 ml de biodiesel e 74 ml de glicerol, o que representa uma taxa de conversão da ordem de 92% (Dib, 2010).

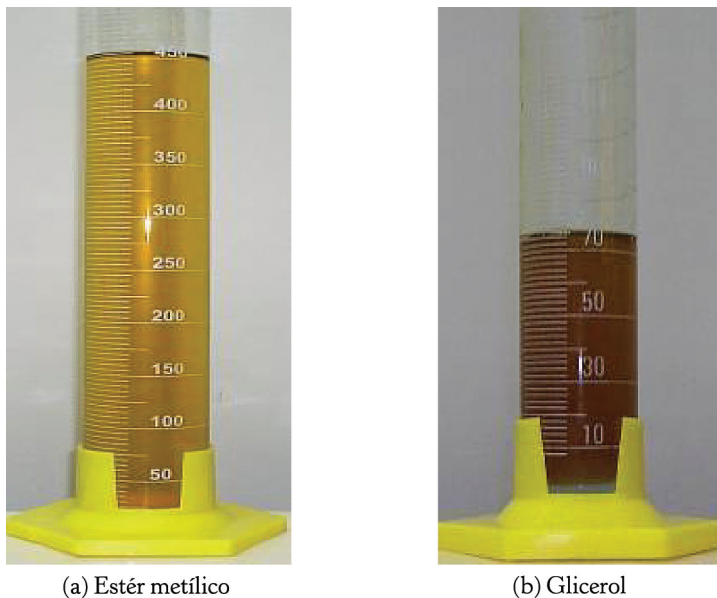


Figura 27.13 – Resultado da transesterificação do óleo de soja: a) éster metílico; b) glicerol  
Fonte: Dib (2010)

Segundo Dib (*ibidem*), utilizou-se também a rota metílica para produzir o biodiesel com o óleo de fritura, com o hidróxido de sódio como catalisador. Antes que a matéria-prima fosse submetida ao processo de transesterificação alcalina, 500 ml de óleo de fritura a uma faixa de temperatura entre 55 e 65 °C foram misturados a uma solução formada por 0,3 ml de  $H_2SO_4$  P.A. em 35 ml de metanol anidro. Após a mistura, a esterificação foi conduzida à temperatura de entrada do óleo, com o recipiente fechado, durante um período aproximado de uma hora. A mistura foi colocada num funil de separação, onde permaneceu decantando por 12 horas a fim de remover a camada formada na superfície, composta de ácido sulfúrico, metanol e de água, formada durante a reação de esterificação, como pode ser observado na Figura 27.14.

Após a neutralização do ácido inorgânico, o óleo de fritura é submetido a uma nova análise do teor de acidez orgânica. Como o óleo atingiu um teor abaixo de 2%, a amostra foi submetida à transesterificação, sendo o óleo pré-tratado colocado sob agitação com uma solução formada por 2 g de NaOH P.A. em 100 ml de metanol anidro, conforme mostrado na Figura 27.10, durante uma hora (*ibidem*).



(a) Óleo pré-tratado



(b) Óleo decantado

Figura 27.14 – Óleo de fritura pré-tratado e submetido à decantação

Fonte: Dib (2010)

Segundo Dib (ibidem), foi possível observar a mudança de cor do conteúdo em agitação, de “amarelo translúcido” para um tom “escuro e transparente”, da mesma forma como ocorreu com o óleo de soja e conforme é mostrado na Figura 27.15.



(a) início



(b) Término

Figura 27.15 – Processo de transesterificação do óleo de fritura usado pré-tratado

Fonte: Dib (2010)



A amostra transesterificada foi colocada em um funil de separação, onde permaneceu em decantação por um período de 12 horas para obtenção das fases, conforme é ilustrado na Figura 27.16.



Figura 27.16 – Processo de decantação de fritura pré-tratado e metóxido de sódio

Fonte: Dib (2010)

A separação do biodiesel foi feita após drenar completamente a fase inferior da amostra, que consiste na remoção do glicerol, de parte dos catalisadores ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{NaOH}$ ) e do excesso de metanol. Na Figura 27.17 podem ser observados os volumes de ésteres e de glicerol formados a partir do óleo de fritura usado.



(a) Éster metílico



(b) Glicerol

Figura 27.17 – Resultado da transesterificação do óleo de fritura reciclado com metóxido de sódio

Fonte: Dib (2010)

O volume de 500 ml de óleo de fritura reagidos com 100 ml de metanol resultou em 495 ml de ésteres metílicos e em 56 ml de glicerol, sendo o excesso de metanol evaporado durante os minutos finais de reação. Isso representa uma taxa de conversão da ordem de 92% (ibidem).

Foi produzido ainda o biodiesel com a rota etílica, utilizando o óleo de soja degomado e, também, o óleo de fritura usado reciclado, juntamente com o hidróxido de sódio.

Cada matéria-prima foi submetida ao processo de transesterificação alcalina após os tratamentos (quando necessários) e o volume de 500 ml foi aquecido à mesma faixa de temperatura de antes (entre 55 e 65°C). Em seguida, a matéria-prima foi adicionada à solução de 2 g de NaOH P.A. em 150 ml de etanol anidro (ibidem).

Após as respectivas misturas, as reações foram conduzidas à temperatura de entrada dos óleos, com os recipientes fechados para evitar a evaporação prematura do etanol, durante um período aproximado de uma hora. Enquanto o óleo era adicionado, foi possível observar a mudança de cor do conteúdo em agitação, de “amarelo translúcido” para um tom “escuro e transparente” e, em seguida, para um tom “transparente” e pouco mais “claro” durante um pequeno período de tempo, de 10 a 15 segundos (ibidem).

Na Figura 27.18 é observado o comportamento de uma amostra de óleo de soja degomado durante a reação de transesterificação.

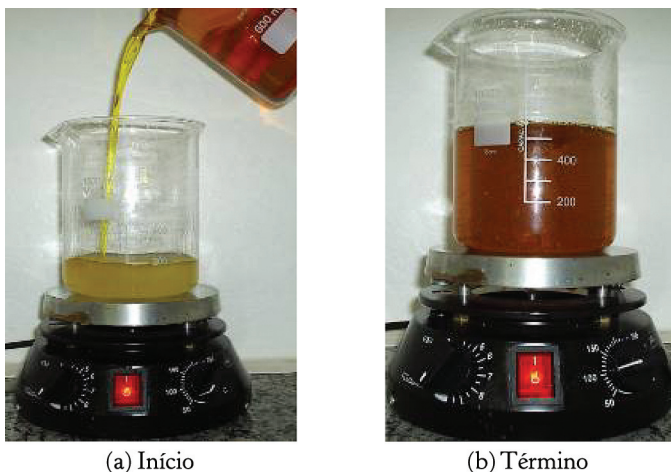


Figura 27.18 – Processo de transesterificação do óleo de soja degomado por rota etílica

Fonte: Dib (2010)

A amostra transesterificada foi colocada em um funil de separação, onde permaneceu em decantação por um período de 12 horas.

A Figura 27.19 mostra as fases de biodiesel e glicerol ainda misturadas ao final do período da decantação.



Figura 27.19 – Final da decantação do óleo de soja degomado transesterificado por rota etílica  
Fonte: Dib (2010)

O passo seguinte consistiu na separação da amostra, após ter sido neutralizada e lavada, para que a glicerina fosse retirada junto com a água e, em seguida, o biodiesel remanescente fosse submetido ao processo de secagem. Não houve a necessidade de submeter o biodiesel à passagem pela resina, pois o catalisador era removido com a lavagem. Entretanto, esta lavagem prejudicava muito a amostra e foram verificadas alternativas a fim de realizar a separação das fases, porém não foram obtidos resultados satisfatórios.

### **Produção de biodiesel no reator usando óleo de fritura reciclado**

Após os estudos realizados em laboratório, foi produzido biodiesel em maior escala com o reator Biocom 100, mostrado na Figura 27.20, doado pela empresa Biocom Biocombustível S.A. de Campo Grande (MS) à Unesp de Ilha Solteira, para incrementar as pesquisas na área de biodiesel, que até então eram restritas ao nível laboratorial. O reator funciona por processo de batelada e tem uma capacidade de processar 100 litros por vez.



Figura 27.20 – Reator Biocom 100

Fonte: Dib (2010)

Devido às diversas dificuldades encontradas para produção do biodiesel por rota etílica, decidiu-se pela não realização desta etapa no reator, restringindo o processo de produção à rota metílica (ibidem).

O óleo residual de fritura foi submetido ao processo de transesterificação alcalina após seu tratamento para redução do seu teor de ácidos graxos livres.

Uma solução formada por 500 g de NaOH P.A. em 16 litros de metanol anidro foi preparada durante 15 minutos à temperatura média de 40°C e, em seguida, foram adicionados 80 litros de óleo, após terem sido aquecidos simultaneamente em outro recipiente à uma faixa de temperatura entre 55 e 65°C (ibidem).

Após a mistura, a pressão no interior do reator foi ajustada para 2,5 atm, a temperatura do termostato foi reajustada para 90°C e a reação foi conduzida até 15 minutos após o desligamento automático do sensor de temperatura. A mistura transesterificada foi decantada por um período de 12 horas.

Após a drenagem completa do glicerol, submeteu-se o biodiesel remanescente ao processo de filtração na resina de troca iônica, para neutralização do catalisador básico. O pH da amostra de biodiesel após a neutralização ficou pouco ácido, em torno de 6,0.

Ao final do processo foram obtidos cerca de 76 litros de biodiesel e 20 litros de glicerol, sendo o excesso de metanol evaporado durante os minutos finais de reação. Isso representa uma taxa de conversão de 95%, que pode ser melhorada, segundo o fabricante do reator, à medida que a prática de produção for aperfeiçoada, podendo chegar até 98% (ibidem).

### Caracterização básica do biodiesel produzido e das misturas constituídas

De acordo com Dib (ibidem), para realizar a caracterização do biodiesel e das misturas feitas com base no biodiesel comercial B5, foi adicionada a quantidade necessária de B100 de cada um dos tipos de biodiesel (animal, vegetal e de óleo de fritura residual), para obter as respectivas proporções B25, B50 e B75.

A Figura 27.21 representa cada uma das misturas produzidas e testadas, assim como o biodiesel comercial.

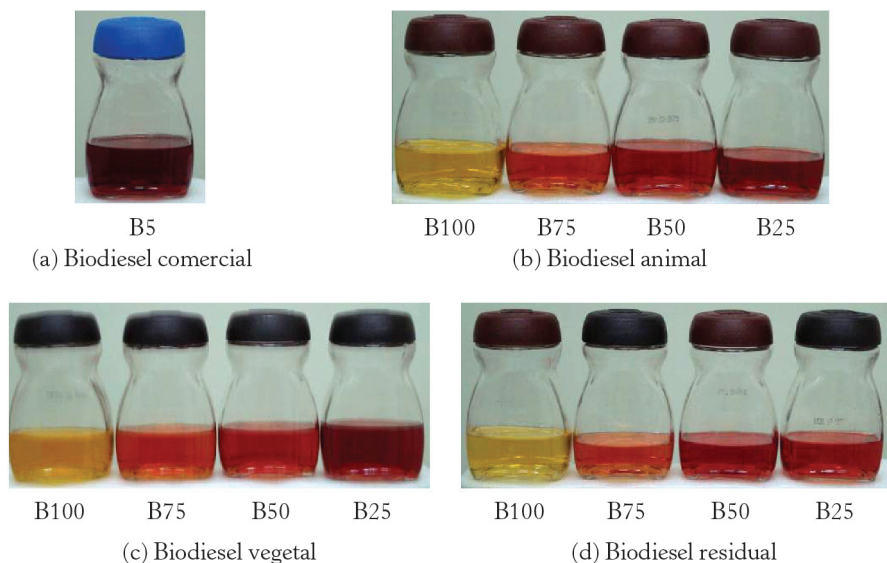


Figura 27.21 – Amostras de cada uma das misturas de biodiesel produzidas

Fonte: Dib (2010)

Para a certificação do biodiesel produzido, foram realizados testes básicos para determinação de pH, densidade, viscosidade e ponto de fulgor.

Para a determinação do pH foi usado um processo simples e convencional de imersão de uma fita indicadora representada na Figura 27.22.

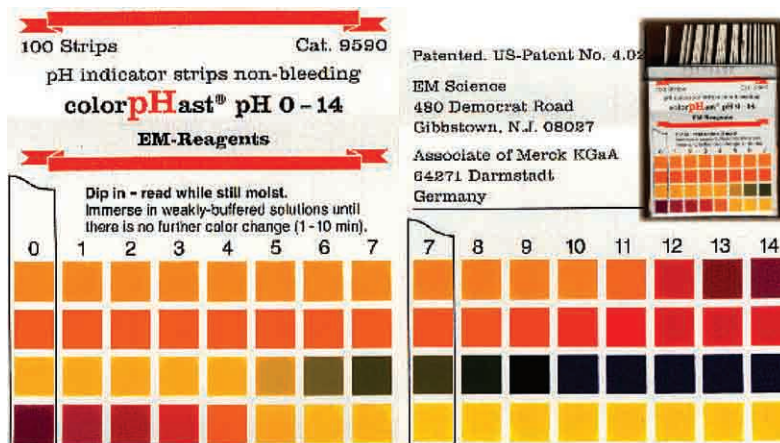


Figura 27.22 – Fitas indicadoras para determinação do pH

Fonte: Merck (2010) apud Dib (2010)

Para determinação da densidade foi utilizado um picnômetro (Figura 27.23a) e uma balança de precisão (Figura 27.23b) da marca Shimadzu, modelo UX420, com a precisão de 0,001 g.

A viscosidade foi medida por um viscosímetro tipo pêndulo, fabricado pela VEB MLW (Rheo-Viscosimeter), com precisão de medida de 1%, mostrado na Figura 27.24.



(a) Picnômetro



(b) Balança de precisão

Figura 27.23 – Equipamentos utilizados para determinação da densidade

Fonte: Dib (2010)



Figura 27.24 – Equipamento utilizado para determinação da viscosidade  
Fonte: Dib (2010)

A determinação do ponto de fulgor é feita seguindo a norma ASTM D92-52, por meio do método Cleveland, pelo equipamento mostrado na Figura 27.25.



Figura 27.25 – Equipamento utilizado para determinação do ponto de fulgor  
Fonte: Dib (2010)

Na Tabela 27.5 são apresentadas algumas das propriedades dos combustíveis utilizados nos testes em motores de combustão interna.

Tabela 27.5 – Caracterização do biodiesel utilizado nos testes à temperatura ambiente

Origem	Composição	Densidade (g/ml)	Viscosidade (cSt)	Ponto de fulgor (°C)
Comercial	B5	0,871	3,9	51
Animal	B100	0,905	5,8	183
	B75	0,891	5,6	98
	B50	0,887	4,7	66
	B25	0,878	4,6	60
Vegetal	B100	0,899	4,8	178
	B75	0,886	4,7	87
	B50	0,883	4,5	61
	B25	0,878	4,0	56
Residual	B100	0,910	6,1	181
	B75	0,894	5,4	110
	B50	0,896	5,3	71
	B25	0,879	4,1	56

Fonte: Dib (2010).

## Aplicação de biodiesel em motores de combustão interna

### Testes em um grupo gerador de eletricidade utilizando vários tipos de biodiesel e proporções de misturas

O biodiesel produzido na Unesp de Ilha Solteira com o óleo residual de fritura foi submetido a testes em um grupo gerador de 6 KVA, a fim de se comparar a quantidade de energia por unidade de volume, com os óleos combustíveis B100 produzidos a partir do sebo bovino (na época comercializado pelo frigorífico Bertin de Lins, atual JBS) e de óleo de soja (comercializado pela empresa Granol). Foram realizados testes com o *blend* B5, composição de 5% de biodiesel em 95% de diesel fóssil, comercializado nos postos de combustível.

Os testes de carga no grupo gerador foram estudados ainda com os *blends* B75, B50 e B25, formados a partir da mistura do biodiesel B100 produzido com o *blend* B5, cujas características foram apresentadas na Tabela 27.5.

Cada teste foi realizado durante um intervalo de tempo de 60 minutos, para cada nível de potência resistiva ajustada no grupo gerador (0, 1, 2 e 3 KW), a fim de mensurar o consumo de cada combustível (Dib, 2010).



A Figura 27.26 apresenta o grupo gerador diesel da marca Blizzer utilizado nos testes com o biodiesel. As especificações técnicas do motor e do gerador são apresentadas nas Tabelas 27.6 e 27.7, respectivamente.



Figura 27.26 – Grupo gerador utilizado nos testes com biodiesel

Fonte: Dib (2010)

Tabela 27.6 – Especificações técnicas do motor LD 100

Modelo	LD 100
Tipo	Monocilindro de 4 tempos
Injeção	Injeção direta
Refrigeração	Refrigerado a ar
Diâmetro X curso (mm)	86 X 70
Cilindrada (l)	0,406
Rotação nominal (rpm)	3.000/3.600
Potência nominal kW (HP)	5,7 (7,7) / 6,7 (9,0)
Velocidade média do pistão (m/s)	7,0 / 8,4
Pressão efetiva média kPa (kgf/cm <sup>2</sup> )	561,6 (5,73) / 543,5 (5,55)
Consumo de combustível g/kWh (g/HPh)	<273 (<201) / < 285 (<210)
Consumo de óleo lubrificante g/kWh (g/HPh)	<4,08 / (<3)
Capacidade do tanque de combustível (l)	30
Quantidade de óleo lubrificante cheio (l)	1,65
Quantidade de óleo lubrificante efetivo (l)	0,60
Sentido de rotação do eixo visto do volante	Horário
Tipo de lubrificação	Bomba de óleo
Tipo de partida	Manual retrátil e elétrica
Peso líquido (kg)	48

Fonte: Blizzer apud Dib (2010).

Tabela 27.7 – Especificações técnicas do gerador BL6500 ES

Modelo	BL6500 ES
Tensão	110/240 V monofásico
Potência contínua de trabalho	6,25 kVA – 5.630 W
Potência máxima em <i>stand-by</i>	6,33 kVA – 5.700 W
Frequência	60 Hz

Fonte: Blizzer apud Dib (2010).

Para a simulação da carga no gerador, foi construído um painel com 25 lâmpadas incandescentes de 220 V e 200 W ligadas em paralelo, perfazendo uma carga resistiva total de 5 kW, conforme mostrado na Figura 27.27.



Figura 27.27 – Painel de cargas utilizado nos testes do grupo gerador

Fonte: Dib (2010)

Os resultados dos testes de aplicação do biodiesel no grupo gerador foram realizados com as cargas de 0 kW, 1 kW, 2 kW e 3 kW. O Gráfico 27.14 representa o comparativo entre os consumos médios de combustível em períodos de 60 minutos de teste para cada carga de potência resistiva acoplada ao gerador elétrico, tendo como base o B5 comercial.

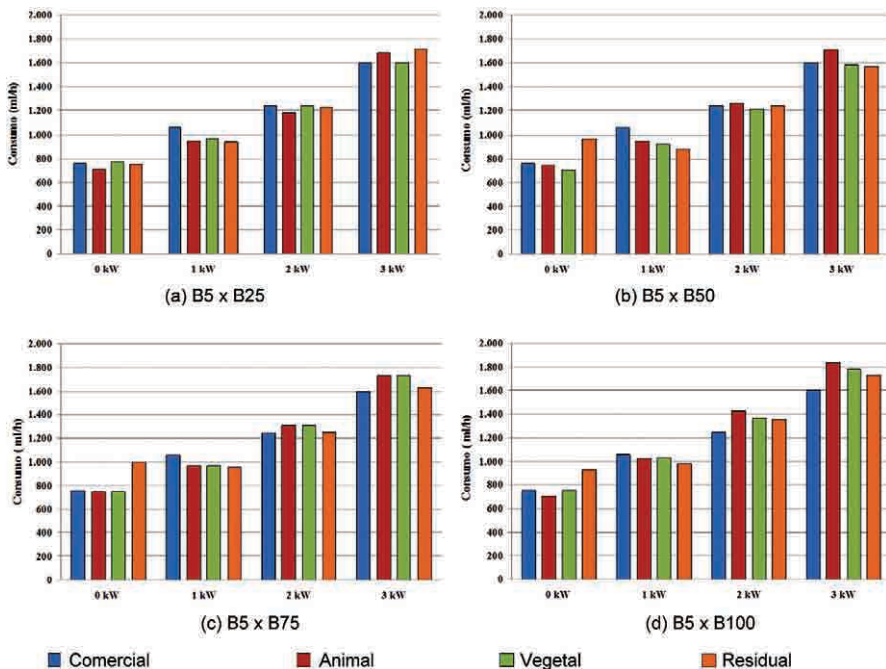


Gráfico 27.14 – Consumo de combustível no motor em função da carga no gerador

Fonte: Dib (2010)

De acordo com o Gráfico 27.14, com o aumento da carga no gerador ocorreu um aumento do consumo do combustível no motor. Para uma mesma carga, não existe uma variação significativa desse consumo entre os tipos de combustíveis testados.

Complementarmente, o Gráfico 27.15 demonstra o comparativo entre as temperaturas médias dos gases de exaustão para cada um dos testes realizados, tendo como base o B5 comercial.

De acordo com o Gráfico 27.15, nota-se que ocorreu um aumento da temperatura dos gases de exaustão de acordo com o aumento das cargas resistivas e que para uma mesma carga não houve uma variação significativa da temperatura entre os combustíveis utilizados nos testes.

Por fim, foi concluído que, do ponto de vista econômico, devido à proximidade dos resultados alcançados de consumo entre as amostras testadas, os óleos combustíveis provenientes de rejeitos industriais e comerciais, quando tratados de forma adequada, são mais viáveis que o biodiesel proveniente da soja.

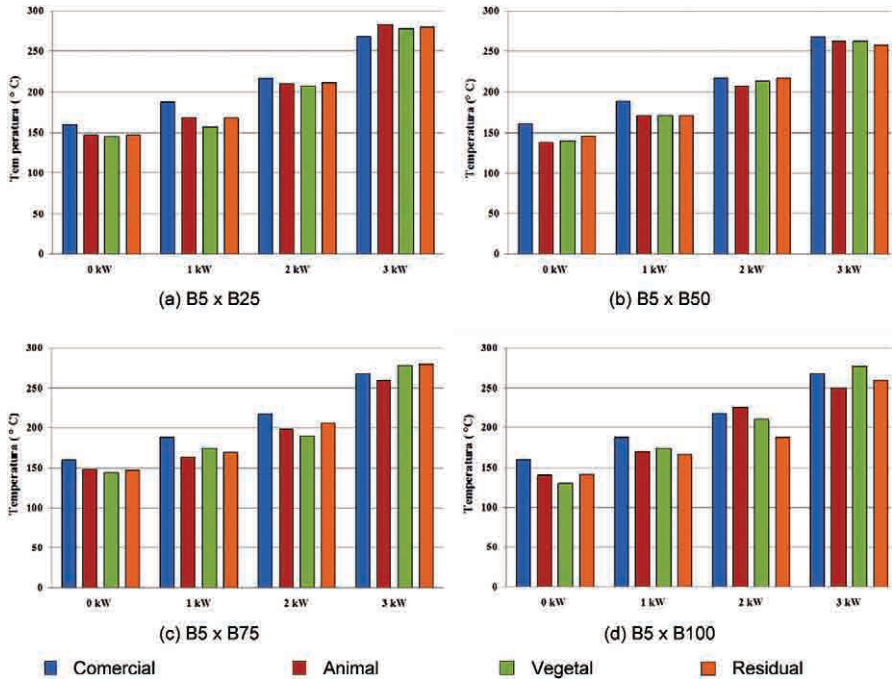


Gráfico 27.15 – Temperatura dos gases de exaustão

Fonte: Dib (2010)

### Testes em um motor estacionário a biodiesel, com vários níveis de contaminação do óleo lubrificante

Outro experimento realizado em motor de combustão interna com a utilização do biodiesel produzido na Unesp de Ilha Solteira foi conduzido por Scarpin (2010), que analisou o consumo específico de um motor estacionário 10 HP a Diesel da marca Branco, funcionando com Biodiesel comercial (B5) na fase de amaciamento e depois com Biodiesel B100 de óleo residual, com diferentes níveis de contaminação do óleo lubrificante (1, 2 e 3%), simulando o desgaste real ao longo do tempo

A Figura 27.28 ilustra o motor utilizado nos testes, sendo suas especificações técnicas apresentadas na Tabela 27.8.

As propriedades químicas do Biodiesel B100 residual utilizado nas etapas do experimento estão apresentadas na Tabela 27.9.



Figura 27.28 – Motor estacionário Branco, modelo BD 10.0

Fonte: Branco apud Scarpin (2010)

Tabela 27.8 – Especificações técnicas do motor estacionário BD 10.0

Modelo	BD 10.0	
Tipo	Mono-cilíndrico de 4 tempos	
Injeção	Injeção direta	
Refrigeração	Refrigerado a ar	
Diâmetro X curso (mm)	86 X 70	
Cilindrada (cc)	406	
Rotação nominal (rpm)	3.000	3.600
Potência nominal kW (HP)	5,7 - (7,7)	6,7 - (9,0)
Velocidade média do pistão (m/s)	7,0	8,4
Pressão efetiva média kPa (kgf/cm <sup>2</sup> )	561,6 - (5,73)	543,5 - (5,55)
Consumo Específico de Combustível g/kWh (g/HP.h)	<273 - (<201)	< 285 - (<210)
Consumo específico de óleo lubrificante g/kWh (g/HP.h)	< 4,08	< 3
Capacidade do tanque de combustível (l)	5,5	
Quantidade de óleo lubrificante cheio (l)	1,65	
Sentido de rotação do eixo visto do volante	Horário	
Tipo de lubrificação	Bomba de óleo	
Tipo de partida	Manual retrátil e elétrica	
Peso líquido (kg)	48	

Fonte: Branco apud Scarpin (2010)

Tabela 27.9 – Propriedades químicas do Biodiesel B100 residual

<b>Massa específica (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0,910
<b>Viscosidade (cSt)</b>	6,1
<b>Ponto de Fulgor</b>	181
<b>PH</b>	6-7

Fonte: Scarpin (2010)

Esse estudo foi realizado seguindo a Norma NBR 1585 da ABNT e os testes de consumo de combustível do motor foram divididos em cinco etapas, sendo a primeira referente ao período de amaciamento do motor. Nesta etapa, o motor operou com Biodiesel B5 comercial por 20 horas, sem carga e a cerca de 3.000 rpm.

A segunda etapa correspondeu ao funcionamento do motor com Biodiesel (B100 residual), sem contaminação do óleo de motor com Biodiesel. Ele operou 40 horas, sem carga e a aproximadamente 3.000 rpm.

A partir da terceira etapa, o óleo lubrificante foi contaminado em determinadas proporções normatizadas para efeito de simulação de funcionamento de um motor com uma determinada vida e, conseqüentemente, um desgaste significativo entre as partes móveis do mesmo. Na terceira etapa, o motor funcionou com Biodiesel (B100 residual), com contaminação do óleo de motor em 1% do seu volume total (cerca de 16,5 ml de Biodiesel no óleo lubrificante); sem carga e por volta de 3.000 rpm, tendo sido medido o consumo de combustível.

O mesmo procedimento foi realizado para a quarta e a quinta etapas, diferindo apenas na porcentagem de contaminação do óleo lubrificante. Na quarta etapa foram adicionados 2% de Biodiesel (cerca de 33 ml) no cárter do mesmo, e na quinta etapa foram adicionados 3% de Biodiesel (cerca de 49,5 ml) no óleo de motor. Com isso, foram medidos os consumos em cada uma destas etapas.

Os consumos específicos em cada um dos testes estão apresentados na Tabela 27.10.

Com os dados obtidos nesse estudo foi possível verificar um ligeiro aumento no consumo específico de combustível, funcionando com Biodiesel B100 residual, quando comparado com o consumo específico do motor operando com Biodiesel B5 comercial e com Biodiesel B100, este por volta de 8,6%. Pelo fato de não terem ocorrido alterações nas características origi-

nais do motor como variação no sistema de ignição e de injeção de combustível, pode-se afirmar que o resultado obtido foi satisfatório.

Tabela 27.10 – Consumo específico em função da condição de operação do motor

Etapas	Condição	Combustível	Duração (h)	Consumo (l)	Consumo específico (g/HP.h)
1	Amaciamento	B5 comercial	20	10,00	59,091
2	Sem contaminação	B100 residual	40	21,71	64,149
3	1% de contaminação	B100 residual	40	21,72	64,173
4	2% de contaminação	B100 residual	40	21,72	64,173
5	3% de contaminação	B100 residual	40	21,75	64,267

Fonte: Scarpin (2010)

Com relação ao funcionamento do motor, ele operou com o Biodiesel B100 sem variações na rotação e não houve aumento de fumaça e a partida do motor não se alterou. Todas essas características informadas revelam que um motor a Diesel (mecânico-bomba injetora) pode funcionar com Biodiesel B100 residual obtendo bons resultados.

Posteriormente, amostras do óleo lubrificante contaminado passarão por análises laboratoriais para se verificar a influência do tipo de biodiesel e da porcentagem de contaminação sobre as propriedades do lubrificante (viscosidade, ponto de fulgor, quantidade de partículas magnéticas, índices de acidez e alcalinidade), sendo este o objeto de estudo de um grupo de pesquisa em Tribologia da Unesp de Ilha Solteira, parceiro do Nuplen.

## **Desenvolvimento e construção de equipamentos/acessórios utilizados no processo de produção de biodiesel**

### **Construção de uma miniusina de baixo custo para produção de biodiesel**

Uma miniusina de baixo custo foi projetada e está em fase final de construção na Unesp de Ilha Solteira, sendo ela destinada à produção de biodiesel por batelada por meio do processo de transesterificação, utilizando a rota metílica e hidróxido de sódio como catalisador. A referida usina foi montada com base no reator Biocom-100 e sua capacidade de produção será de 300 litros de biodiesel por dia, considerando 8 horas de trabalho diário.

Numa primeira etapa a miniusina será fixa e destinada à produção de biodiesel a partir da reciclagem de óleo de cozinha usado, e numa segunda etapa ela será montada sobre rodas para poder ser usada no campo, neste caso sendo necessária a incorporação de uma prensa para extração do óleo vegetal e, também, de um gerador de energia a biodiesel para os acionamentos elétricos, tornando a planta autosuficiente. O biodiesel produzido passará por testes laboratoriais para verificar suas propriedades físico-químicas básicas e depois será testado em motores de combustão interna automotivos e estacionários (geradores), sendo avaliado o consumo e o desempenho para diversas cargas, comparando com o biodiesel comercial B5 e com vários tipos de misturas (B25, B50 e B75) feitas com base no biodiesel comercial.

As Figuras 27.29 e 27.30 representam, respectivamente, o esquema e fotos da miniusina de biodiesel em construção, sendo possível observar o reator Biocom-100 utilizado nas pesquisas até então.

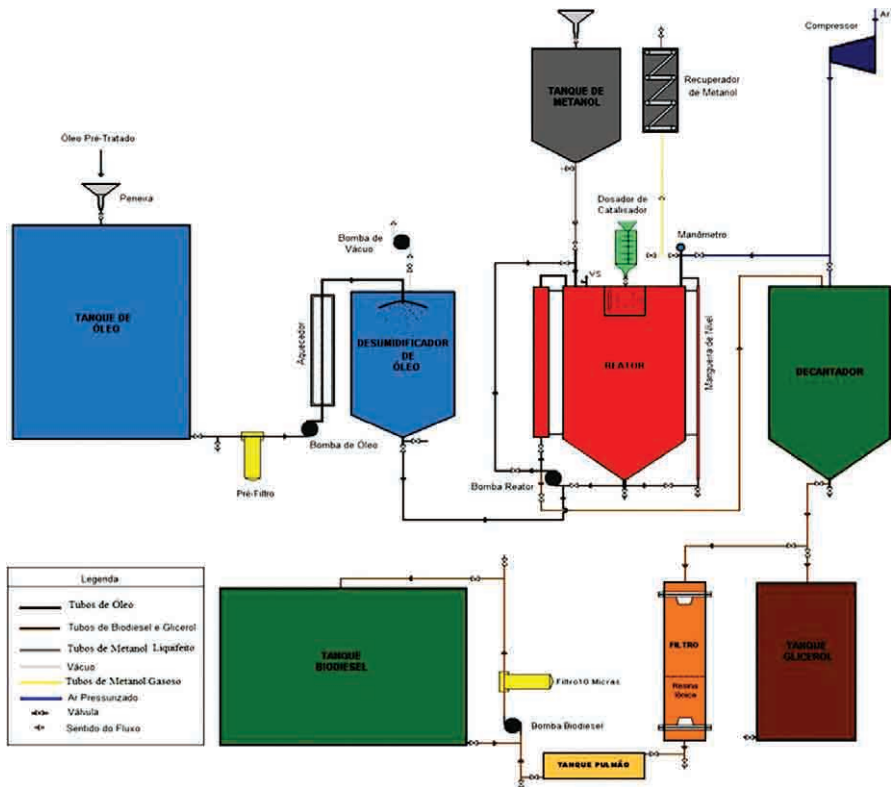


Figura 27.29 – Esquema da miniusina para produção de biodiesel na Unesp de Ilha Solteira  
Fonte: Mesquita (2011)





Figura 27.30 – Fotos da miniusina para produção de biodiesel na Unesp de Ilha Solteira

### **Desenvolvimento de instrumentação para controle de processo na produção de biodiesel**

Santos e Pedro (2010) desenvolveram um sensor de condutividade elétrica capaz de diferenciar o biodiesel da glicerina. Inicialmente esse sensor foi desenvolvido para utilização em bancada laboratorial, mas atualmente está sendo aprimorado para utilização no processo produtivo da miniusina mencionada anteriormente, de modo que, após o processo de decantação, tais fases possam ser enviadas automaticamente para reservatórios distintos, por meio do acionamento de válvulas de controle.

Parte-se da observação que a fase mais pesada, composta de glicerina bruta, é impregnada por excessos utilizados de álcool, de água e de catalisador, que apresenta propriedades iônicas. Com isso, a condutividade elétrica da fase glicérol é alta e maior do que na fase menos densa, constituída de uma mistura de ésteres alquílicos (biodiesel). Assim, foi construído um circuito eletrônico que permite o registro dessa mudança de condutividade, com base no trabalho desenvolvido por Cardoso (2009).

Para a elaboração do sensor, foi desenvolvido um aparato experimental composto por um sistema metálico, constituído por duas hastes metálicas fixadas em um suporte de material isolante e nas pontas dessas hastes foram colocadas duas placas de material condutor, que devem ficar em contato com o fluido em análise. Nas outras extremidades das hastes foram ligados dois fios condutores que enviam o sinal da condutividade entre as placas a um circuito eletrônico microcontrolado, capaz de identificar o biodiesel e a glicerina e realizar os procedimentos definidos. A Figura 27.31 representa o sensor desenvolvido.

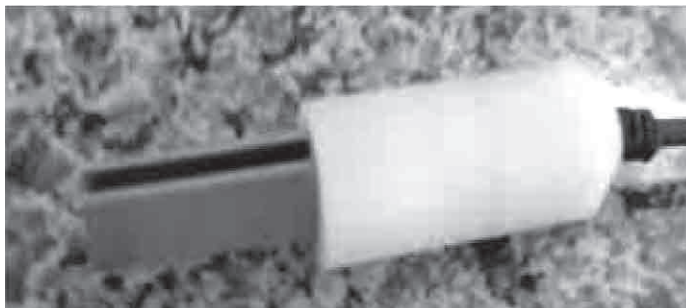


Figura 27.31 – Sensor de condutividade elétrica

Fonte: Santos e Pedro (2010)

Este sensor diferencia-se daquele desenvolvido por Cardoso (2009) por possuir um circuito eletrônico composto de um microcontrolador PIC 16F877A, capaz de executar toda a lógica de controle para simular o acionamento das válvulas para separar o biodiesel da glicerina e incluindo ainda um visor de LCD para mostrar algumas informações durante o processo.

Após calibrado o sensor em uma faixa de sensibilidade, conforme condutividades elétricas esperadas, e uma vez atingidos esses valores, o circuito eletrônico microcontrolado simulou o acionamento das válvulas por meio de LEDs e mostrou em um visor de LCD o fluido em contato com o sensor e a sua respectiva resistência elétrica.

Antes da montagem do sensor propriamente dito, foi realizada a elaboração do projeto eletrônico e a simulação do mesmo de forma computacional. A Figura 27.32 representa o circuito sendo simulado, na qual a resistência elétrica apresentada é de 100 k $\Omega$ , que pela lógica desenvolvida o sensor identifica como glicerina.

Nota-se na Figura 27.32 que o LED que representa o acionamento da válvula que direciona a glicerina para um determinado reservatório está acionado e indicado com a cor vermelha.

A Figura 27.33 representa a simulação computacional do circuito eletrônico, na qual de acordo com a resistência mostrada no visor do LCD, o biodiesel estaria em contato com o sensor. Nota-se ainda o LED que representa o acionamento da válvula, que direcionaria o biodiesel para um determinado reservatório, se encontra acionado e indicado com a cor verde.



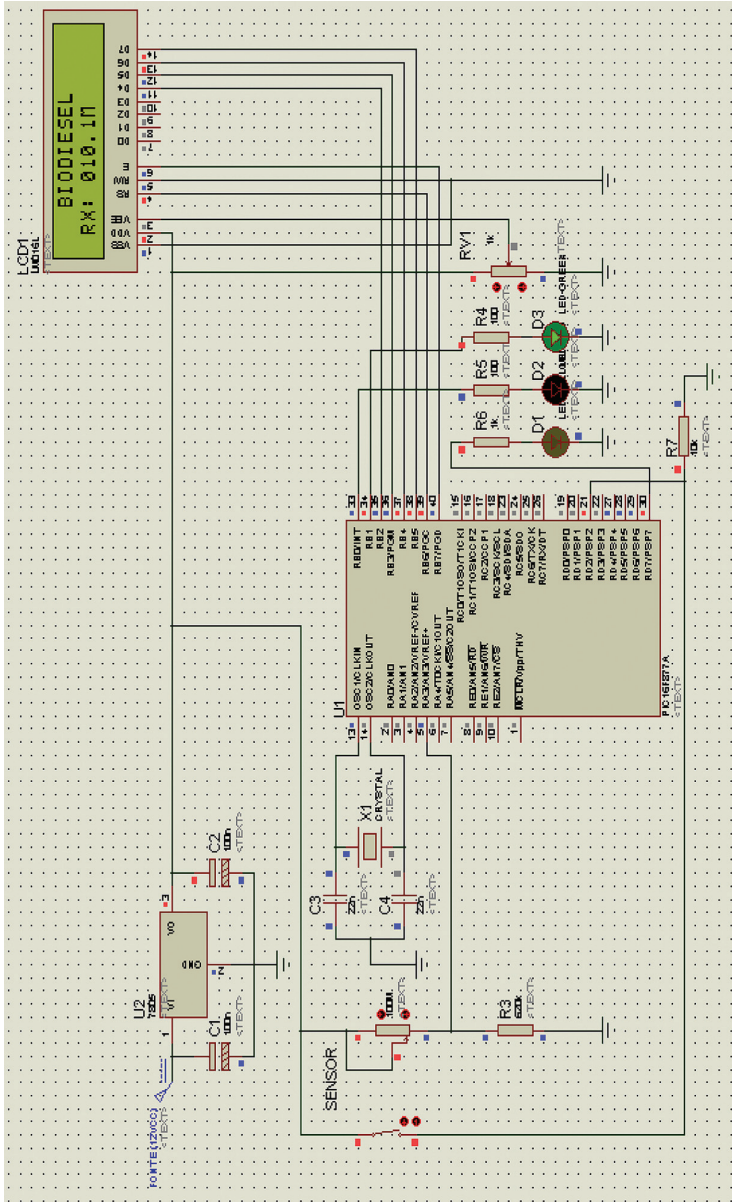


Figura 27.33 – Simulação do circuito eletrônico com resistência elétrica equivalente à do biodiesel

Fonte: Santos e Pedro (2010)

Após o desenvolvimento do projeto eletrônico e as respectivas simulações, foram seguidas as etapas triviais para a confecção de uma placa de circuito impresso, como passagem do desenho do circuito para a placa de fenolite, furação, corrosão da placa com percloroeto de ferro, soldagem dos componentes eletrônicos e por fim a montagem do circuito em uma caixa plástica, conforme mostrado na Figura 27.34.



Figura 27.34 – Caixa plástica com o circuito eletrônico

Fonte: Santos e Pedro (2011)

Para ligar o sensor ao circuito eletrônico foi usado um conector do tipo XLR e um cabo blindado, a fim de evitar que ruídos e interferências pudessem interferir no sinal recebido pelo microcontrolador.

A resistência elétrica do cabo e a das chapas metálicas foram medidas com o auxílio de um multímetro e apresentaram o valor de  $3 \Omega$ , e foram desconsiderados durante a realização dos ensaios para o trabalho realizado.

Para a realização dos ensaios com o sensor, este foi montado com uma fonte de corrente contínua em 12 V, juntamente com o sensor preso em uma garra, e colocou-se 80 ml de biodiesel e glicerina em cada um dos béqueres, conforme representado na Figura 27.35.



Figura 27.35 – Aparato experimental para a realização dos testes

Fonte: Santos e Pedro (2010)

Após a calibração do sensor, ele foi inserido no bquer com glicerina para que fosse analisado o valor da resistência desta e avaliar o funcionamento da lógica desenvolvida. Na Figura 27.36 é mostrado o sensor em contato com a glicerina.

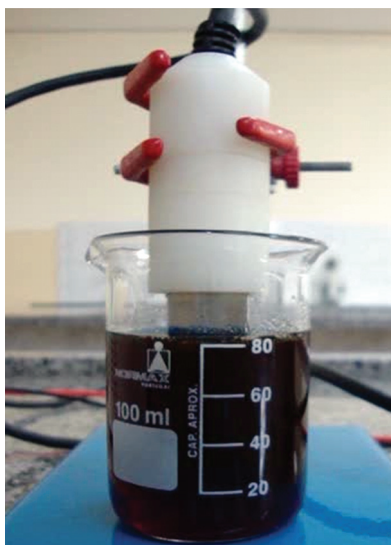


Figura 27.36 – Sensor em contato com a glicerina

Fonte: Santos e Pedro (2010)

As informações do líquido em contato com o sensor puderam ser observadas no visor do LCD e o circuito eletrônico acionou o LED vermelho, simulando o acionamento da válvula que direcionaria a glicerina a um reservatório. A Figura 27.37 apresenta as informações do visor de LCD, que mostra o valor da resistência da glicerina com o símbolo k, que significa uma unidade de medida na ordem de  $k\Omega$ .



Figura 27.37 – Visor de LCD com informações da glicerina

Fonte: Santos e Pedro (2010)

Foram coletados os valores de resistência apresentada no visor de LCD, nos primeiros 60 segundos em que o sensor esteve em contato com este líquido. O Gráfico 27.16 apresenta a resistência elétrica em função do tempo.

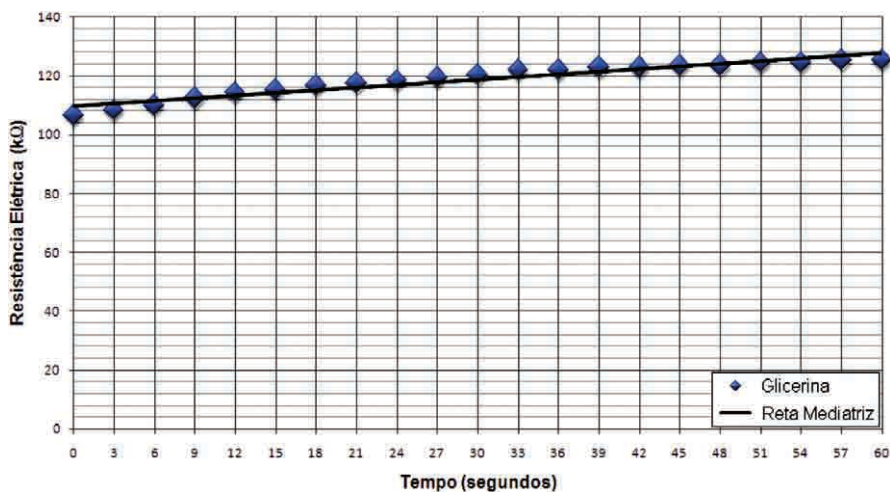


Gráfico 27.16 – Valores da resistência elétrica da glicerina em função do tempo

Fonte: Santos e Pedro (2010)

De acordo com o Gráfico 27.16, os valores da resistência elétrica apresentados pela glicerina encontraram-se entre 100 e 120 k $\Omega$ , sendo que estes foram crescendo em função do tempo, como representado pela reta mediatriz. Neste caso, tal líquido ou poderia estar sofrendo ionização ou o valor apresentado pelo sensor não era estável. Com os valores do gráfico apresentado calculou-se o valor médio para a resistência elétrica da glicerina, que foi de  $118,77 \pm 5,78$  k $\Omega$ .

Utilizando-se dos mesmos procedimentos experimentais, foram realizados os testes com o biodiesel, conforme mostrado na Figura 27.38.



Figura 27.38 – Sensor em contato com o biodiesel

Fonte: Santos e Pedro (2010)

Assim, como para a glicerina, quando o líquido em contato com o sensor foi o biodiesel, o circuito acionou o LED representando o acionamento da válvula para direcioná-lo a um reservatório.

Na Figura 27.39 é mostrada a indicação do LED verde e no visor do LCD a indicação de que o biodiesel era o líquido que estava em contato com o sensor, além da resistência elétrica na ordem de M $\Omega$ , representado apenas como M.





Figura 27.39 – Visor de LCD com informações do biodiesel

Fonte: Santos e Pedro (2010)

Os valores encontrados da resistência elétrica do biodiesel nos primeiros 60 segundos podem ser observados no Gráfico 27.17.

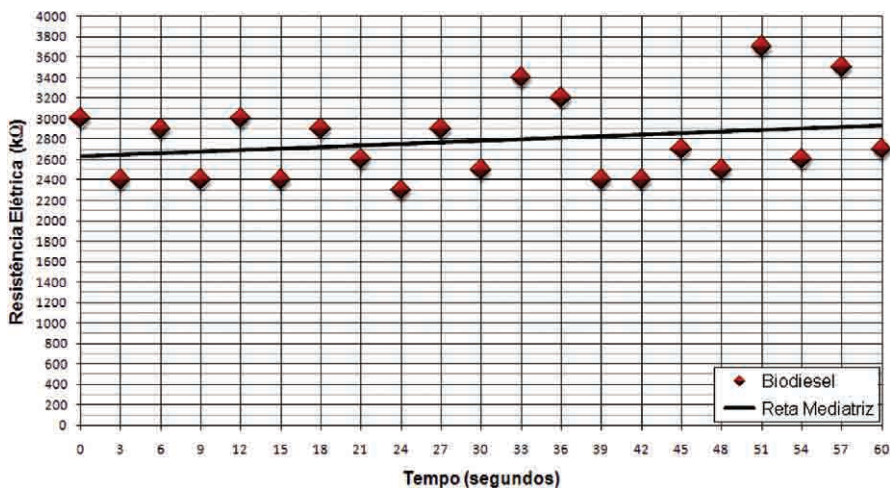


Gráfico 27.17 – Valores da resistência elétrica do biodiesel em função do tempo

Fonte: Santos e Pedro (2010)

Conforme apresentado na Figura 27.56, os valores da resistência elétrica para o biodiesel variaram em torno de 2,3 e 3,7 M $\Omega$  e por meio da reta mediatriz pôde-se perceber que tais valores foram crescentes em função do tempo. Pôde-se notar ainda que para este líquido houve intensa variação dos valores encontrados devido ao alto valor da resistência do biodiesel. O valor médio encontrado para o biodiesel foi de  $2,78 \pm 0,4$  M $\Omega$ .

Para facilitar a visualização de quão diferentes são os valores encontrados para as resistências elétricas do biodiesel e da glicerina, montou-se o Gráfico 27.18, que possui os valores relativos aos dois líquidos.

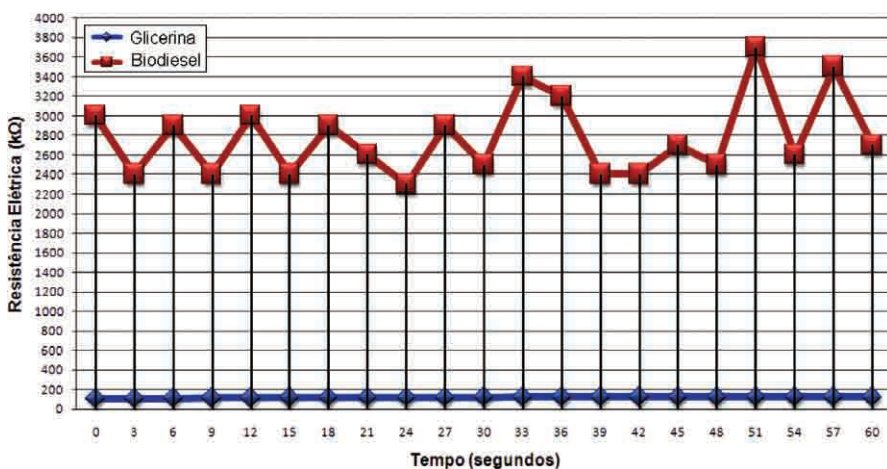


Gráfico 27.18 – Valores da resistência da glicerina e do biodiesel em função do tempo

Fonte: Santos e Pedro (2010)

Analisando-se o Gráfico 27.18, nota-se uma grande diferença entre os valores de resistência elétrica da glicerina e do biodiesel, representados pelas cores vermelha e azul, respectivamente.

A variação da resistência elétrica apresentada pela glicerina torna-se desprezível e o gráfico pode ser considerado linear quando comparado com a variação que se obteve com os valores do biodiesel.

Apesar das grandes variações, pode-se perceber claramente a ordem de grandeza das resistências para cada um dos fluidos, fato este que é suficiente para implantar o sensor em plantas de biodiesel, que utilizam decantadores para separar as fases glicerina e biodiesel e, assim, poder direcioná-los para diferentes reservatórios para armazenagem.

## Utilização dos subprodutos do processo de produção do biodiesel

Assim como já ocorre atualmente com a cadeia produtiva do setor sucroalcooleiro, na qual por meio do processamento da cana-de-açúcar se produz açúcar e álcool, tendo como subproduto o bagaço, que é queimado em caldeiras produzindo energia (eletricidade e calor), na cadeia produtiva do biodiesel, a glicerina bruta (glicerol), obtida como subproduto do processamento das plantas oleaginosas e demais óleos e gorduras usados como matéria-prima, pode também ser aproveitada.

A cada litro de biodiesel produzido são produzidos entre 100 e 200 ml de glicerol, sendo parte dele usada em síntese de resinas e ésteres, tabaco, papéis, aplicações farmacêuticas, cosméticos e alimentos, e parte dele é descartada, uma vez que existe uma oferta maior que a demanda, sendo que este desbalanço pode se tornar ainda maior à medida que for sendo aumentada a produção de biodiesel para atender a necessidade de adição ao diesel, de acordo com o previsto pelo plano do governo.

Glicerol ou Propano-1,2,3-triol é um composto orgânico líquido à temperatura ambiente (25°C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. O termo glicerina refere-se ao produto glicerol, na forma comercial com pureza acima de 95%, cujo uso atualmente é distribuído de acordo com o Gráfico 27.19. Entretanto, os processos para purificação são complexos e de alto custo, para que seja possível alcançar as exigências em graus de pureza necessária para estes fins.

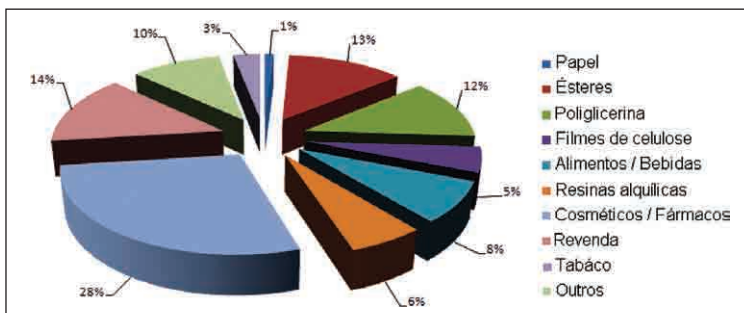


Gráfico 27.19 – Representação dos percentuais de utilização da glicerina em diversos setores

Fonte: Adaptado de Purificação et al. (2008) apud Daun (2009)

Diante desse contexto estão sendo realizados diversos estudos para o aproveitamento do glicerol residual do processo produtivo de biodiesel na miniusina da Unesp de Ilha Solteira, tanto pelo Nuplen quanto por parte de grupos de pesquisa da Agronomia e Zootecnia, os quais, embora ainda em fase inicial, serão brevemente destacados a seguir.

Estão sendo desenvolvidos pelos zootecnistas estudos para a utilização do glicerol na formulação de rações para aves e suínos por se constituir em um produto rico em energia (4.320 kcal de energia bruta por kg para o glicerol puro) e com alta eficiência de utilização pelos animais. Outro aspecto que justifica a aplicação desse coproduto da indústria de biodiesel na produção de alimentos para animais é que parte das matérias-primas renováveis produzidas para atender finalidades energéticas retornará à cadeia alimentar para gerar produtos de alto valor nutricional. Além de servir como fonte de energia, o glicerol também pode ter efeitos positivos sobre a retenção de aminoácidos ou nitrogênio, conforme sumarizado por Cerrate et al. (2006); a ação do glicerol inibe a atividade das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glutamato desidrogenase, que pode resultar em economia dos aminoácidos gluconeogênicos e favorecer a deposição de proteína corporal.

Recentemente no Brasil, os estudos de Menten et al. (2008) e Berenchtein (2008) demonstraram que a glicerina pode se constituir em um ingrediente energético com potencial para uso em dietas de frangos de corte e suínos em crescimento e terminação, respectivamente. Os resultados de pesquisas gerados nos últimos anos evidenciam que o glicerol proveniente da produção de biodiesel pode ser incluído na formulação de rações para aves e suínos até cerca de 10%, sem afetar adversamente o desempenho, a saúde, a qualidade da carcaça e da carne dos animais. Porém, como a qualidade da glicerina produzida industrialmente pode ser variável, sua utilização merece certos cuidados, o que indica a necessidade de mais estudos avaliando a viabilidade técnica e também a econômica da utilização deste subproduto bruto da produção de biodiesel.

O glicerol também pode ser utilizado no cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais, que aproveitam resíduos orgânicos agrícolas e agroindustriais como fontes de carbono e energia, sendo isso objeto de estudos na Agronomia. Como consequência, tem-se uma redução das perdas de carbono, energia e outros nutrientes, a princípio não disponíveis para a

alimentação humana e/ou animal. O produto final formado no processo, o basidioma, é um alimento de valor nutritivo elevado, sendo rico em aminoácidos e pobre em calorias e gorduras, podendo colaborar de modo significativo na alimentação humana e fortalecimento e/ou recuperação de pessoas com saúde debilitada.

Por fim, a mais nova forma de aproveitamento do glicerol, além das já apresentadas, é para a produção de energia, atuando ele como cossustrato de algum processo de biodigestão de matéria orgânica, assunto este atualmente em estudo no Nuplen (Daun, 2009). Graças ao seu alto teor de carbono facilmente degradável, o glicerol possui propriedades favoráveis à digestão anaeróbica em biodigestores quando associada a resíduos orgânicos com alto teor de nitrogênio.

No entanto, além da produção do glicerol, há também a geração de outros subprodutos no processo de produção de biodiesel, que são as tortas. Atualmente elas são empregadas na adubação orgânica, geração de energia e de forma menos expressiva como alimentos para animais (Abdalla et al., 2008), sendo este outro tema de objeto de estudos na área de Zootecnia da Unesp de Ilha Solteira.

A utilização de tortas e farelos apresenta alguns pontos importantes, no que tange a sua introdução na alimentação de animais, entre eles a infestação pós-colheita pelo fungo *Aspergillus flavus*, que produz uma toxina de alta letalidade, a aflatoxina, porém cuidados durante a colheita e armazenagem reduzem este problema.

Outro ponto crítico é o fato de as tortas e farelos apresentarem fatores antinutricionais ou compostos bioativos, desde agentes goitrogênicos, glucosinolatus, ácido fítico, gossipol, tanino e saponinas, até compostos altamente tóxicos como o forbol, encontrado no pinhão manso (Makkar; Becker, 1998). Mas esses compostos na maioria dos casos são termolábeis e o desenvolvimento de variedades livres dos mesmos pode favorecer a utilização das tortas na alimentação de ruminantes e de monogástricos.

O desenvolvimento e o aprimoramento de processos para inativar princípios tóxicos ou alergênicos presentes nestes subprodutos possibilitam a utilização em rações para animais, tornando-os passíveis de agregação de valores à produção de diversas oleaginosas como mamona, pinhão manso, nabo forrageiro e crambe.

## Considerações finais

Em relação ao que foi exposto neste capítulo, a demanda energética mundial por combustíveis líquidos poderá ser suprida parcialmente por combustíveis renováveis, como por exemplo, o biodiesel.

Todavia, diversos estudos devem ser viabilizados para tornar a produção do biodiesel economicamente viável e competitiva frente ao óleo diesel do petróleo, de acordo com as normas de qualidade exigidas internacionalmente.

Diante desse contexto, a Unesp de Ilha Solteira continuará desenvolvendo pesquisas nesta área, em especial por meio da utilização da rota etílica, tendo em vista a grande produção de etanol na região Oeste paulista. Além disso, serão incrementadas as pesquisas sobre a aplicação do glicerol no processo de produção de biogás e, também, do biodiesel e percentuais de misturas em motores de combustão interna, em um banco dinamométrico, analisando-se não só o desempenho como também os impactos ambientais das emissões.

## Referências bibliográficas

- ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C.; GODOI, A. R.; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P. Utilização de subprodutos da indústria do biodiesel na alimentação de ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37 (Suplemento especial). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45, 2008. Lavras. *Anais...* SBZ, 2008. p.260-279.
- ALBUQUERQUE, M. C. G.; MACHADO, Y. L.; TORRES, A. E. B.; AZEVEDO, D. C. S.; CAVALCANTE JUNIOR, C. L. Properties of biodiesel oils formulated using different biomass sources and their blends. *Renewable Energy*, v.34, n.3, p.857-9, 2009.
- ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). *Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2009*. Rio de Janeiro: 2009, 210p.
- \_\_\_\_\_. *Boletim Mensal de Biodiesel*. [s. d.] Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=50768&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&xps=&cachebust=1306236213766>. Acesso em: 24 maio 2011.
- BARBOSA, R. L.; SILVA, F. M.; SALVADOR, N.; CASTRO NETO, P. Eficiência de um motor à compressão utilizando diesel e misturas de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BODIESEL, 3, 2006, Varginha. *Anais...* Varginha: [s. n.], 2006. p.1134-9.

- BBC – BRASIL. *EU quer eliminar carros a gasolina e a diesel de suas cidades até 2050*. Disponível em: [http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2011/03/110328\\_transportes\\_ue\\_pai.shtml](http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2011/03/110328_transportes_ue_pai.shtml). Acesso em: 24 abr. 2011.
- BERENCHTEIN, B. *Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação*. Piracicaba, 2008. 45p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Programa Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- BIODIESELBR. *Tudo sobre biodiesel*. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/biodiesel/biodiesel.htm>. Acesso em: 23 maio 2011.
- BIODIESELBRASIL. *Biodiesel no mundo*. Disponível em: [http://www.biodieselbrasil.com.br/biodiesel\\_mundo.asp](http://www.biodieselbrasil.com.br/biodiesel_mundo.asp). Acesso em: 24 maio 2011.
- BUENO, A. V. *Análise da liberação de energia em motores diesel operando com combustíveis alternativos*. Campinas, 2003. 103f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas.
- \_\_\_\_\_. *Análise da operação de motores diesel com misturas parciais de biodiesel*. Campinas, 2006. 103f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas.
- CADERNO 55. *Biodiesel – fatos e atualidades*. 2007. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/caderno-55-biodiesel-fatos-e-atualidades-pdf-pdf-a32515.html>. Acesso em: 24 maio 2011.
- CÂMARA, G. M. S. *Biodiesel Brasil – estado atual da arte*. Piracicaba: 2006. Disponível em: [http://www.cib.org.br/pdf/biodiesel\\_brasil.pdf](http://www.cib.org.br/pdf/biodiesel_brasil.pdf). Acesso em: 1 maio 2010.
- CERRATE, S.; YAN, F.; WANG, Z. et al. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. *International Journal of Poultry Science*, v.5, n.11, p.1001-7, 2006.
- COSTA NETO, P. R. *Obtenção de ésteres alquílicos (biodiesel) por via enzimática a partir do óleo de soja*. Florianópolis, 2002. 133f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemática, Universidade Federal de Santa Catarina.
- COSTA NETO, P. R. C.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v.23, ano 4, p.531-7, 2000.
- DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. *Química Nova On Line*, v.32, n.3, abr 2009. Disponível em: [http://www.google.com.br/url?sa=t&source=web&cd=1&ved=0CBUQFjAA&url=http%3A%2F%2Fquimicanova.sbq.org.br%2Fqn%2Fqnol%2F2009%2Fvol32n3%2F20QN09125.pdf&ei=gvFKTOHeNIyzuAfewLG8DQ&usq=AFQjCNFfclm8evHz6w2ZiWr0NBkhY-l\\_zA&sig2=KDA5YsAycETiLMv8j0pDfw](http://www.google.com.br/url?sa=t&source=web&cd=1&ved=0CBUQFjAA&url=http%3A%2F%2Fquimicanova.sbq.org.br%2Fqn%2Fqnol%2F2009%2Fvol32n3%2F20QN09125.pdf&ei=gvFKTOHeNIyzuAfewLG8DQ&usq=AFQjCNFfclm8evHz6w2ZiWr0NBkhY-l_zA&sig2=KDA5YsAycETiLMv8j0pDfw). Acesso em: 24 maio 2011.
- DAUN, L. G.; MESQUITA, R. A. C.; RAMOS, R. A. V. *Alternativa para o uso do glicerol obtido da produção de biodiesel em biodigestores anaeróbios como otimiza-*

- dor da produção de biogás*. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BODIESEL, 2009, Natal.
- DIB, F. H. *Produção de biodiesel a partir de óleo residual reciclado e realização de testes comparativos com outros tipos de biodiesel e proporções de mistura em um motorizador*. Ilha Solteira, 2010. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista (Unesp).
- EBB (European Biodiesel Board). *PRESS RELEASE 2009-2010: EU biodiesel industry restrained growth in challenging times*. Bruxelas: 2010. Disponível em: [http://www.ebb-eu.org/EBBpressreleases/EBB%20press%20release%202009%20prod%202010\\_capacity%20FINAL.pdf](http://www.ebb-eu.org/EBBpressreleases/EBB%20press%20release%202009%20prod%202010_capacity%20FINAL.pdf). Acesso em: 20 maio 2011.
- \_\_\_\_\_. *Production of biodiesel in the EU*. [s. d.] Disponível em: <http://www.ebb-eu.org/biodiesel.php#eupro>. Acesso em: 20 maio 2011.
- \_\_\_\_\_. *Statistics*. [s. d.] Disponível em: <http://www.ebb-eu.org/stats.php>. Acesso em: 28 abr. 2011.
- EIA (Energy Information Administration). *International Energy Outlook – 2010*. Washington: 2010. Disponível em: [http://www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/pdf/0484\(2010\).pdf](http://www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/pdf/0484(2010).pdf). Acesso em: 23 abr. 2011.
- EPE (Empresa de Pesquisa Energética). *Balanço Energético Nacional – 2010*. Rio de Janeiro: 2010. Disponível em: [https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio\\_Final\\_BEN\\_2010.pdf](https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2010.pdf). Acesso em: 23 abr. 2011.
- \_\_\_\_\_. *Plano Decenal de Expansão de Energia – 2019*. Brasília: 2010. Disponível em: [http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/noticias/2010/PDE2019\\_03Maio2010.pdf](http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/noticias/2010/PDE2019_03Maio2010.pdf). Acesso em: 23 abr. 2011.
- FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja: taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, v.28, n.1, p.19-23, 2005.
- FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE SÃO CARLOS; CARDOSO, D. et al. *Sensor de condutividade e método do escoamento do biodiesel e de produtos em fase líquida de condutividades diversas*. BR n.PI 0705954 – 0 A2, 19 dez. 2007, 18 ago. 2009. 34p.
- GERPEN, J. V.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. *Biodiesel Production Technology*. USA: National Renewable Energy Laboratory – NREL/SR-510-36244, 2004. 110p.
- KHALIL, C. N. As tecnologias de produção de biodiesel. *O futuro da indústria: biodiesel*, Brasília, v.14, p.83-90, dez. 2006. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/o-futuro-da-industria-biodiesel-pdf-a32084.html>. Acesso em: 24 maio 2011.
- KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J. *Manual de biodiesel*. Tradução de Luiz Pereira Ramos. São Paulo: E. Blücher, 2006.
- LIMA, P.C. R. O Biodiesel no Brasil e no Mundo e o Potencial do Estado da Paraíba. *Consultoria Legislativa*, Brasília, maio 2007. Disponível em: [http://apache.camara.gov.br/portal/arquivos/Camara/internet/publicacoes/estnottec/tema16/2007\\_1951.pdf](http://apache.camara.gov.br/portal/arquivos/Camara/internet/publicacoes/estnottec/tema16/2007_1951.pdf). Acesso em: 24 maio 2011.



- LIMIRO, D. *Biodiesel: a bola da vez*. 2007. Disponível em: <http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/DowContador?OpenAgent&unid=B64E4E9C736D5A8F832572C900449BCD>. Acesso em: 24 maio 2011.
- MACHADO, P. R. M. *Ésteres combustíveis em motor de ciclo diesel sob condições de pré-aquecimento e variação no avanço de injeção*. Santa Maria, 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Concentração em Mecanização Agrícola, Universidade Federal de Santa Maria.
- MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGBE, A. O.; BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chemistry*, v.62, p.207-15, 1998.
- MENTEN, J. F. M. et al. Avaliação da glicerina proveniente do biodiesel como ingrediente para rações de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO 2008 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2008, Santos. *Anais...* Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2008. p.66.
- MESQUITA, R. A. C. *Desenvolvimento e teste de um sistema de trigerção de energia utilizando biodiesel como combustível*. Ilha Solteira, 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Departamento de Engenharia Mecânica, Unesp.
- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. *Testes e ensaios para validação do uso da mistura B5 para motores e veículos*. Brasília: 2009, 176p.
- MME (Ministério de Minas e Energia). *Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis*. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/spg/menu/publicacoes.html>. Acesso em: 24 maio 2011.
- MORANDIM, A. A.; RIBEIRO, R. L.; SANTOS, R. O.; COMPRI, I. G.; TORRES, R. B. Estudo comparativo da produção de biodiesel proveniente do óleo de fritura e do óleo de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5, 2008, *Anais...* Varginha: [s. n.], 2008. p.164-78.
- MORÓN-VILLAREYES, J. A.; SOLD, C.; AMORIM, A. M.; PIZZOLATTI, M. G.; MENDONÇA JUNIOR, A. P.; D'OCA, M. G. M. Diesel/biodiesel proportion for by-compression ignition engines. *Fuel*, v.86, n.12-13, p.1977-82, 2007.
- NASCIMENTO, U. M.; SILVA, F. C.; BRANDÃO, K. S. R.; LOUZEIRO, H. C.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; MOURA, K. R. M. Montagem e implantação de usina piloto de baixo custo para produção de biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, 1, 2006, Brasília. *Anais...* Brasília: [s. n.], 2006. v.2, p.147-50.
- NATIONAL BIODIESEL BOARD. *EPA Requires 800 million Gallons of Biodiesel in the U.S. Domestic Market in 2011*. Disponível em: [http://www.biodiesel.org/news/pressreleases/20100712\\_EPA\\_800Million.htm](http://www.biodiesel.org/news/pressreleases/20100712_EPA_800Million.htm). Acesso em: 20 jul. 2011.
- OLIVEIRA, E. V. A.; DOMINIKI, T.; SANTA MARIA, L. C. Análise comparativa das rotas metilica e etilica para obtenção de biodiesel através da transesterificação do óleo de soja via catálise básica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

- PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5, 2008, Varginha. *Anais...* Varginha: [s. n.], 2008. p.369-75.
- PARENTE, E. J. S. *Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado*. Fortaleza: 2003, 66p. Disponível em: <http://www.balcom.org.br:8080/trade/upload/1189381129469503743.pdf>. Acesso em: 24 maio. 2011.
- PENTEADO, R. A. N.; CUNHA, R. B. C.; PENTEADO, A. P. *Biodiesel: uma sinopse das conjunturas brasileira e mundial*. Curitiba: 2007. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/uso/4.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2011.
- PEREIRA, R. G.; OLIVEIRA, C. D.; OLIVEIRA, J. L.; OLIVEIRA, P.C. P.; FELLOWSC, C. E.; PIAMBA, O. E. Exhaust emissions and electric energy generation in a stationary engine using blends of diesel and soybean biodiesel. *Renewable Energy*, v.32, n.14, p.2453-60, 2007.
- PESWIKI. *Diesel Engine*. Disponível em: <http://peswiki.com/index.php/PowerPe> dia: Diesel\_engine. Acesso em: 1 maio 2011.
- PROGRAMA NACIONAL DE PRODUÇÃO E USO DO BIODIESEL. *Biodiesel: O novo combustível do Brasil*. Disponível em: [http://www.biodiesel.gov.br/docs/PNPB\\_LancRede.pdf](http://www.biodiesel.gov.br/docs/PNPB_LancRede.pdf). Acesso em: 24 maio 2011.
- QUESSADA, T. P. Obtenção de biodiesel a partir de óleo de soja e milho utilizando catalisadores básicos. In: PRÊMIO MERCOSUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2008, Buenos Aires. *Obtenção de biodiesel a partir de óleo de soja e milho utilizando catalisadores básicos*. Buenos Aires, 2008. p.6-8.
- RIBEIRO, M. F.; PEIXOTO, J. A. A.; SOUZA, C. G. O biodiesel no contexto do desenvolvimento sustentável: um estudo exploratório. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 28, 2008, Rio de Janeiro. *O biodiesel no contexto do desenvolvimento sustentável: um estudo exploratório*. Rio de Janeiro, 2008. p.9-10.
- SANTOS, D. C.; ALVES, C. T.; NÓBREGA, S. D. Comparação de desempenho de um motor monocilindro do ciclo diesel operando com diesel e biodiesel (B100). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3, 2006, Varginha. *Anais...* Varginha: [s. n.], 2006. p.988-92.
- SANTOS, P. S. B.; PEDRO, R. B. *Desenvolvimento de um sensor de condutividade elétrica para diferenciação de fases glicerina e biodiesel*. Araçatuba, 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Mecatrônica) – UniSalesiano.
- SANTOS, T. M. B.; AQUINO, L. C. L.; CASTRO, A. A.; SILVA, G. F. Estudo do processo de transesterificação alcalina dos óleos de soja residual e refinado visando à obtenção de biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 4, 2007, Varginha. *Anais...* Varginha: [s. n.], 2007. p.1153-60.
- SCARPIN, L. M., RAMOS, R. A. V. R. Determinação do consumo específico de combustível em um motor diesel de pequeno porte, operando com biodiesel e com diversos níveis de contaminação do óleo lubrificante. In: CONGRESSO DE

- INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP DE ILHA SOLTEIRA, 2010, Ilha Solteira. *Anais...* Ilha Solteira: [s. n.], 2010. 4p.
- SEBRAE. *Biodiesel*. Brasília: 2009. Disponível em: <http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/DowContador?OpenAgent&unid=D170D324C7521915832572B200470F63>. Acesso em: 1 maio 2010.
- SHVOONG. *O biodiesel no mundo*. Disponível em: <http://pt.shvoong.com/humanities/1694353-biodiesel-mundo/>. Acesso em 20 abr. 2011.
- SILVA, W. S. D. *Mapeamento de variáveis mercadológicas para a produção de biodiesel a partir da mamona na região nordeste do Brasil*. Recife, 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Pernambuco.
- THINKING AHEAD. *Archive for the biodiesel category*. Disponível em: <http://www.usbthinkingahead.com/category/biodiesel>. Acesso em: 24 maio 2011.
- WANG, Y.; OU, S.; LIU, P.; ZHANG, Z. Preparation of biodiesel from waste cooking oil via two-step catalyzed process. *Energy Conversion and Management*, v.48, n.1, p.184-8, 2006.
- WUST, E. *Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos*. Blumenau, 2004. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau.
- ZIMMERMAN, J. Brazil Oilseeds and Products Annual: 2010 Annual Oilseeds Report. *USDA Foreign Agriculture Service*, p.5, jun.2010. Disponível em: [http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Oilseeds%20and%20Products%20Annual\\_Brasilia\\_Brazil\\_4-6-2010.pdf](http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Oilseeds%20and%20Products%20Annual_Brasilia_Brazil_4-6-2010.pdf). Acesso em: 24 maio 2011.

## Lista de autores

**Adelir A. Saczk** – Laboratório de Eletroanalítica, Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras.

**Adriana Aparecida dos Santos Costa** – Grupo Especial de Ensaio em Voo, Instituto de Pesquisas e Ensaio em Voo, Comando-Geral de Tecnologia Aeroespacial.

**Afonso Lopes** – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.

**Alberto J. Cavalleiro** – Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.

**Alexander Alves da Silva** – Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.

**Ana Carla Resende Fraiz** – Laboratório de Fisiologia Molecular, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa (UFV).

**Ana Flavia de A. Carvalho** – Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

**Ana Paula Dias da Silva** – Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto

de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.

**André L. dos Santos** – Faculdade de Ciências Integradas do Pontal, Universidade Federal de Uberlândia.

**Antonio J. Diniz** – Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira.

**Aparecido C. Gonçalves** – Laboratório de Manutenção Preditiva e de Análise de Óleos, Departamento de Engenharia Mecânica, Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira.

**Caio Antonio Carbonari** – Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Botucatu.

**Cassio Roberto M. Maia** – Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira.

**Cecília Laluze** – Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.

**Celso Eduardo Tuna** – Laboratório de Otimização de Sistemas Energéticos, Departamento de Energia, Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Guaratinguetá.

**Christian Jeremi Coronado Rodriguez** – Grupo de Estudos em Tecnologias de Conversão de Energia, Instituto de Engenharia Mecânica, Universidade de Itajubá, *campus* de Itajubá.

**Claudia Dorta** – Faculdade de Tecnologia (Fatec), *campus* de Marília.

**Cláudio Cavariani** – Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Botucatu.

**Crispin Humberto Garcia-Cruz** – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Concentração, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de São José do Rio Preto.

- Cristiane Aparecida Martins** – Divisão de Engenharia Aeronáutica, Instituto Tecnológico de Aeronáutica.
- Daniela Alonso Bocchini Martins** – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Danilo Luiz Flumignan** – Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados (Cempeqc), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara, e Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP), *campus* Avançado Matão.
- Douglas F. da Silva** – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Rio Claro
- Éder Aparecido Garcia** – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Botucatu.
- Edivaldo Domingues Velini** – Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Botucatu.
- Eduardo Alves de Almeida** – Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de São José do Rio Preto.
- Eduardo Maffud Cilli** – Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Eduardo Rossini Guimarães** – Laboratório de Agricultura, Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Edvaldo Aparecido Amaral da Silva** – Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Botucatu.
- Edwil Aparecida de Lucca Gattás** – Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Eleni Gomes** – Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de São José do Rio Preto.

- Eliana G. M. Lemos** – Laboratório de Microrganismos e Plantas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Elson Longo** – Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica, Departamento de Físico-Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Emanuel R. Woiski** – Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira.
- Fabricio Coutinho de Paula** – Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Rio Claro
- Felipe Thomaz da Câmara** – Colegiado de Engenharia Agrônoma, Universidade Federal do Ceará (UFC), *campus* de Cariri.
- Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes** – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Concentração, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de São José do Rio Preto.
- Fernando H. Dib** – Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira/Petrobrás.
- Gabriel Mazzi Leme** – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Gilberto Hirotsugu Azevedo Koike** – Engenheiro mecânico e consultor autônomo.
- Giorgio Eugenio Oscare Giacaglia** – Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade de Taubaté, *campus* de Juta.
- Gisele Cristina Ravaneli** – Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Álcool (Microbiologia das Fermentações), Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.

- Heloiza Ferreira Alves Prado** – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira.
- Hideko Yamanaka** – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Iraides Aparecida de Castro Villela** – Departamento de Ciências Básicas e Ambientais, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP), *campus* de Lorena.
- Isabel Duarte Coutinho** – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Jackson A. M. de Souza** – Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Jairo Osvaldo Cazetta** – Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Janaína Gagliardi Bara** – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Janete Aparecida Desidério** – Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Jessica C. Medina Gallardo** – Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- João Batista C. Silva** – Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira.
- João Cláudio Thoméo** – Laboratório de Bioengenharia, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de São José do Rio Preto.



- Jonas Contiero** – Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Rio Claro
- José Antonio de Souza Rossato Júnior** – Laboratório de Ecologia Aplicada, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- José Eduardo de Oliveira** – Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados (Cempeqc), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- José Giacomo Baccarin** – Departamento de Economia Rural, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- José Jorge Gebara** – Departamento de Economia Rural, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- José Luz Silveira** – Laboratório de Otimização de Sistemas Energéticos, Departamento de Energia, Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Guaratinguetá.
- Josiel José da Silva** – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Julio Santana Antunes** – Laboratório de Otimização de Sistemas Energéticos, Departamento de Energia, Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Guaratinguetá.
- Kamilla Ortega** – Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Karin M. Ludwig** – Faculdade de Ensino Superior de Assis (Fema).
- Kate Cristina Blanco** – Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Rio Claro
- Kléber Pereira Lanças** – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Botucatu.
- Leomar Paulo de Lima** – Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM), *campus* de Uberlândia.

- Leonardo L. Okumura** – Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal de Viçosa.
- Leonardo Lucas Madaleno** – Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Álcool (Microbiologia das Fermentações), Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Lílian Nogueira** – Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de São José do Rio Preto.
- Lucas M. Scarpin** – Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira.
- Lúcia Bollini Braga** – Laboratório de Otimização de Sistemas Energéticos, Departamento de Energia, Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Guaratinguetá.
- Lúcia Maria Carareto Alves** – Laboratório de Microrganismos e Plantas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Luciana Fontes Coelho** – Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Rio Claro
- Luciana Maria Saran** – Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Luiz Octávio Mattos dos Reis** – Departamento de Engenharia Elétrica, Universidade de Taubaté, *campus* de Juta.
- Manoel Victor Franco Lemos** – Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Marcelo C. Fiomari** – Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira/UMOE Bioenergy.
- Marcelo Firmino de Oliveira** – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo (USP), *campus* de Ribeirão Preto.

- Márcia Justino Rossini Mutton** – Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Álcool (Microbiologia das Fermentações), Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Márcio Evaristo da Silva** – Laboratório de Otimização de Sistemas Energéticos, Departamento de Energia, Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Guaratinguetá.
- Marco A. Modenes Jr.** – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Marcos Paulo Mendes** – Curso de Agronomia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Maria da Consolação Fonseca de Albuquerque** – Departamento de Engenharia Civil, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (SP) (DEC-Feis).
- Maria Inês Tiraboschi Ferro** – Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Maria Olivia Campos Masiero** – Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Maria Valnice B. Zanoni** – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Mariana Cortezi** – Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Rio Claro
- Mariana R. Pereira** – Laboratório de Microrganismos e Plantas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Mary Helen Palmutti** – Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Rio Claro
- Maurício Boscolo** – Laboratório de Físico-Química, Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de São José do Rio Preto.

- Melina Cais Jajcic de Oliveira** – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Miguel Angelo Mutton** – Laboratório de Agricultura, Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Miguel Joaquim Dabdoub** – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo (USP), *campus* de Ribeirão Preto.
- Murilo Coelho Theodoro Neves** – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Nelson R. Stradiotto** – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Odair Aparecido Fernandes** – Laboratório de Ecologia Aplicada, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Paula G. Fenga** – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Paulo Avila Neto** – Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Rio Claro
- Paulo Sérgio B. dos Santos** – Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira.
- Pedro de Oliva-Neto** – Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciência e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Assis.
- Rafael Rodrigues Hatanaka** – Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados (Cempeqc), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Raffaele Spinelli** – Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree (CNR/Ivalsa), Itália.

- Regina M. Takeuchi** – Faculdade de Ciências Integradas do Pontal, Universidade Federal de Uberlândia.
- Ricardo A. Romão Júnior** – Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira/Cargill Agrícola SA.
- Ricardo Alan V. Ramos** – Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira.
- Roberta Barros Lovaglio** – Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Rio Claro
- Roberto da Silva** – Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de São José do Rio Preto.
- Rodnei Passolongo** – Núcleo de Planejamento Energético, Geração e Cogeração de Energia (Nuplen), Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Ilha Solteira/Petrobras.
- Rodolfo dos Santos** – Laboratório de Otimização de Sistemas Energéticos, Departamento de Energia, Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Guaratinguetá.
- Rodrigo Sequinel** – Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Biocombustíveis, Petróleo e Derivados (Cempecq), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Rogério Katsume Kimura** – Departamento de Engenharia Mecânica, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (SP) (DEM-Feis).
- Ronney Arismel Mancebo Boloy** – Laboratório de Otimização de Sistemas Energéticos, Departamento de Energia, Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Guaratinguetá.
- Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro** – Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.

- Sandra Regina Pombeiro-Sponchiado** – Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Araraquara.
- Saulo Philipe Sebastião Guerra** – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Botucatu.
- Simoni Anese** – Laboratório de Ecofisiologia de Sementes, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).
- Sue Ellen Ester Queiroz** – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, *campus* de Urutaí.
- Terezinha Ferreira Xavier** – Programa de Pós-graduação em Agronomia (Ciência do Solo), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Thaís C. Maester** – Laboratório de Microrganismos e Plantas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Ulisses Rocha Antuniassi** – Departamento de Engenharia Rural, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Botucatu.
- Valéria Marta Gomes de Lima** – Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Assis.
- Viviane Schuch** – Laboratório de Microrganismos e Plantas, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Wanderley J. Melo** – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Jaboticabal.
- Wendell de Queiróz Lamas** – Laboratório de Otimização de Sistemas Energéticos, Departamento de Energia, Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Guaratinguetá.
- Zuy M. Magriotis** – Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras.

SOBRE O LIVRO

*Formato: 16 x 23 cm*

*Mancha: 27,5 x 49,0 paicas*

*Tipologia: Horley Old Style 11/15*

*1ª edição: 2012*

EQUIPE DE REALIZAÇÃO

*Coordenação Geral*

Marcos Keith Takahashi

A bioenergia constitui atualmente um importante segmento das denominadas energias renováveis, fração cada vez mais representativa entre as matrizes energéticas de vários países do mundo. No Brasil, a pesquisa sobre bioenergia tem se desenvolvido consideravelmente, e seu uso, apontado como exemplo a ser seguido na evolução tecnológica energética da sociedade contemporânea.

Nesse contexto, *Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação* tem por objetivo proporcionar uma visão abrangente sobre as diversas áreas que compõem este segmento, com o intuito de contribuir para melhor compreensão dessa importante energia renovável fundamental para o desenvolvimento do país.

Este livro apresenta uma coletânea de trabalhos realizados por vários pesquisadores do Instituto de Pesquisa em Bioenergia (Bioen) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (Unesp). Essas pesquisas foram agrupadas em cinco partes distintas, em que são mostradas as várias formas de biomassa utilizadas na obtenção de bioenergia; os diversos processos usados na produção de biocombustíveis; as aplicações dos bicombustíveis em motores; os aspectos concernentes à biorrefinaria, alcoolquímica e oleoquímica; e os impactos ambientais, sociais e econômicos da sustentabilidade dos bicombustíveis.