

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

INVESTIGAÇÃO DA BIOMASSA DE *Eichhornia crassipes* (AGUAPÉ) PARA A  
OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO COMO UM PROCESSO  
MITIGATÓRIO DA POLUIÇÃO AQUÁTICA

GIOVANA ROBERTA FRANCISCO BRONZATO

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da Unesp –  
Câmpus de Botucatu, para obtenção do  
título de Mestre em Agronomia  
(Energia na Agricultura)

BOTUCATU – SP

Julho – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

INVESTIGAÇÃO DA BIOMASSA DE *Eichhornia crassipes* (AGUAPÉ) PARA A  
OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO COMO UM PROCESSO  
MITIGATÓRIO DA POLUIÇÃO AQUÁTICA

GIOVANA ROBERTA FRANCISCO BRONZATO

Orientador: Dr. Alcides Lopes Leão  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Ivana Cesarino

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da Unesp –  
Câmpus de Botucatu, para obtenção do  
título de Mestre em Agronomia  
(Energia na Agricultura)

BOTUCATU – SP

Julho – 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

B869i Bronzato, Giovana Roberta Francisco, 1990-  
Investigação da biomassa de *Eichhornia crassipes* (aguapé) para a obtenção de etanol de segunda geração como um processo mitigatório da poluição aquática / Giovana Roberta Francisco Bronzato. - Botucatu : [s.n.], 2016  
xii, 78 f. : fots. color., ils.color., grafs. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2016  
Orientador: Alcides Lopes Leão  
Coorientador: Ivana Cesarino  
Inclui bibliografia

1. Água - Poluição. 2. Aguapé. 3. Etanol. 4. Biomassa vegetal. 5. Hidrólise. I. Leão, Alcides Lopes. II. Cesarino, Ivana. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO: INVESTIGAÇÃO DA BIOMASSA DE *Eichhornia crassipes* (AGUAPÊ) PARA A OBTENÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO COMO UM PROCESSO MITIGATÓRIO DA POLUIÇÃO AQUÁTICA

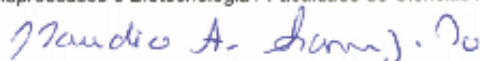
**AUTORA: GIOVANA ROBERTA FRANCISCO BRONZATO**

**ORIENTADOR: ALCIDES LOPES LEÃO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ALCIDES LOPES LEÃO  
Biotecnologia e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP



Prof. Dr. CLAUDIO ANGELI SANSIGOLO  
Dep. de Ciência Florestal / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP



Prof. Dr. RUBENS MACIEL FILHO  
Depto de Processos Químicos / UNICAMP - CAMPINAS

Botucatu, 18 de julho de 2016.

*“(...)Mas para quem tem pensamento forte,  
O impossível é só questão de opinião (...)”*

Só os loucos sabem  
Charlie Brown Jr.

*“(...) Tenha fé em Deus, tenha fé na vida  
Tente outra vez (...)”*

Tente Outra Vez

Raul Seixas/ Paulo Coelho/ Marcelo Motta

*Dedico esse trabalho para as pessoas que  
sempre me ajudaram a realizar os meus sonhos:  
Ao meu pai, Renato, de quem herdei a curiosidade para o novo;  
E a minha mãe, Maria Inêz, que me ensinou o prazer em estudar.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, e a Santa Rita por toda a proteção e ajuda em minha vida.

Aos meus pais por todo o incentivo, apoio e ajuda, pelos conselhos e por sempre acreditarem em mim. Obrigada por todo amor e carinho. Amo vocês!

Ao professor Dr. Alcides Leão e a professora Dra. Ivana Cesarino pela oportunidade, pela orientação, por confiarem no meu trabalho e, principalmente, pelo compartilhamento de conhecimento.

As minhas avós (Zefa e Wanda), as minhas tias (Maria José, Rosângela, Silvia e Isabel), aos meus tios (Carlinhos e Euclides) e aos meus primos (Jamile, Júnior, Mariana e Lucas) e aos “amigos-família” (Elaine, Neto, Maria Elizabeth e Marielle) pelo carinho, conselhos, orações e por sempre torcerem por mim.

As minhas amigas: Carlinha, Jaque e Gabi pela amizade, conselhos e por sempre me acompanharem em uma cerveja gelada, seja nos bons ou nos maus momentos. A Kátia e Thiago, pelos conselhos, apoio e, principalmente, pela amizade desde o tempo da EEL.

A Sabrina e ao Vladi pelo comprometimento e toda ajuda na realização dos experimentos.

A professora Dra. Márcia pela amizade, paciência, ajuda e pelos ensinamentos. A professora Dra Rita por toda ajuda com as análises, desde a realização até a explicação dos resultados e, também, pela amizade.

Ao prof. Dr. Waldemar Venturini Filho por permitir o uso do Laboratório de Bebidas e ao técnico Dr. Ricardo Figueira pela ajuda na realização e nas análises das destilações;

Ao Prof. Dr. Claudio Sansígolo por permitir o uso do Laboratório de Química da madeira e a técnica Liliane Pereira pela ajuda na realização das análises dos componentes vegetais.

As alunas de IC, Jéssica e Maysa, pelo aprendizado que vocês me proporcionaram e, principalmente, pelas risadas, que fizeram das quartas-feiras o meu dia preferido no laboratório.

Aos colegas do laboratório RESIDUALL pela ajuda e pelos momentos compartilhados.

As agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPESP.

A todos que de alguma forma me ajudaram na realização desse trabalho: Muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
1 RESUMO.....	1
SUMMARY.....	2
2 INTRODUÇÃO.....	3
2.1 Biocombustíveis.....	5
2.2 Etanol de Segunda Geração.....	7
2.2.1 Biomassa Lignocelulósica.....	9
2.2.2 Celulose.....	11
2.2.3 Hemicelulose.....	13
2.2.4 Lignina.....	14
2.2.5 Pré-tratamento da Biomassa.....	16
2.2.6 Pré-tratamento Físico.....	17
2.2.7 Pré-tratamento Químico.....	18
2.2.8 Pré-tratamento Biológico.....	19
2.2.9 Pré-tratamento Combinado.....	19
2.2.10 Hidrólise Enzimática.....	20
2.2.11 Fermentação Alcoólica.....	21
2.3 Futuro da Tecnologia de Produção do Etanol.....	22
2.4 <i>Eichornia crassipes</i> – Aguapé.....	24
2.5 Produção de Etanol 2G Utilizando Aguapé como Matéria-Prima.....	27
3 OBJETIVO.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Coleta e Processamento da <i>Eichhornia crassipe</i> .....	30



4.2 Procedimentos e Parâmetros Utilizados na Produção de Etanol 2G.....	30
4.3 Pré-tratamento da Biomassa.....	31
4.4 Caracterização e Análises.....	35
4.4.1 Umidade do Aguapé <i>In Natura</i> .....	35
4.4.2 Metais Pesados.....	35
4.4.3 Caracterização Química.....	35
4.4.4 Análises Termogravimétricas (TG-DTA).....	39
4.4.5 Difração de Raio-X (XRD).....	39
4.4.6 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	40
4.5 Hidrólise Enzimática e Fermentação Alcoólica.....	40
4.5.1 Hidrólise e Fermentação Simultâneas (SSF).....	41
4.5.2 Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF).....	42
4.6 Destilação.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Caracterização Química.....	44
5.1.1 Umidade do Aguapé <i>In Natura</i> .....	44
5.1.2 Metais Pesados.....	45
5.1.3 Eficiência dos pré-tratamentos.....	45
5.1.4 Componentes da <i>Eichhornia crassipes</i> .....	46
5.1.5 Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial (TG-DTA).....	49
5.1.6 Análise de Difração de Raio-X (XRD) .....	52
5.1.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	54
5.2 Produtividade do Etanol 2G com Aguapé como fonte de Biomassa.....	55
5.2.1 Comparação entre o Rendimento do Etanol 2G de Aguapé com Outras Produções de Etanol.....	70
6 CONCLUSÃO.....	72

7 BIBLIOGRAFIA.....73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Problemas causados pelo excesso de <i>Eichornia crassipes</i> no Rio Tietê .....	4
Figura 2 – Esquema da produção de Etanol de 1º e 2º Geração.....	9
Figura 3 – Matéria lignocelulósica em uma célula vegetal.....	10
Figura 4 – Esquema geral dos componentes químicos de um vegetal.....	11
Figura 5 – Representações da celulose.....	12
Figura 6 – Polissacarídeos encontrados na hemicelulose.....	14
Figura 7 – Representações da lignina.....	15
Figura 8 – Pré-tratamento da biomassa.....	16
Figura 9 – Atuação do complexo enzimático: celulase.....	20
Figura 10 – Esquema da fermentação alcoólica.....	21
Figura 11 – Aguapé no Rio Tietê na cidade de São Manuel.....	25
Figura 12 – Corte de uma unidade de aguapé.....	26
Figura 13 – Esquema da metodologia utilizada nos processos de obtenção de etanol de segunda geração a partir do aguapé.....	31
Figura 14 – Esquema geral do processo de pré-tratamento da biomassa de aguapé.....	34
Figura 15 - Esquema de preparação dos biorreatores para os processos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica.....	41
Figura 16 - Fluxograma do processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica simultâneas (SSF).....	42
Figura 17 - Fluxograma do processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica separadas (SHF).....	43
Figura 18- Curvas de TG-DTA do aguapé pré-tratado com (a) ácido sulfúrico; (b) ácido acético; (c) peróxido de hidrogênio; (d) água e (e) aguapé sem pré-tratamento.....	50
Figura 19 – Comparação entre as perdas de massas apresentadas na análise de TG-DTA do aguapé pré-tratado.....	52

Figura 20 - Análise de difração de raio-X do aguapé pré-tratado com (a) ácido sulfúrico; (b) ácido acético; (c) peróxido de hidrogênio; (d) água e (e) aguapé sem pré-tratamento.....	53
Figura 21 - análise de FTIR do aguapé pré-tratado com (a) ácido sulfúrico; (b) ácido acético; (c) peróxido de hidrogênio; (d) água e (e) aguapé sem pré-tratamento.....	55
Figura 22 – Fluxograma das etapas para calcular a produtividade dos processos propostos.....	56
Figura 23 – Produção de etanol 2G nos processos SHF e SSF.....	61
Figura 24 – Rendimento de etanol 2G separado por pré-tratamento e por processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica.....	65
Figura 25 – Produtividade $10^{-4}$ mL/gh) da produção de etanol 2G.....	69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características de algumas categorias de pré-tratamentos: físico, químico, biológico e combinado.....	17
Tabela 2 – Parâmetros utilizados nos processos de pré-tratamentos.....	33
Tabela 3 – Quantidade de matéria seca e umidade no aguapé natural e análise estatística dos resultados.....	44
Tabela 4 – Concentrações de metais pesados na biomassa de aguapé seco.....	45
Tabela 5 – Perdas de massas referentes aos processos de pré-tratamento.....	46
Tabela 6 – Teor de celulose e análise estatística dos resultados.....	47
Tabela 7 – Teor de hemicelulose e análise estatística dos resultados.....	47
Tabela 8 – Teor de lignina e análise estatística dos resultados.....	47
Tabela 9 – Teor de cinzas e análise estatística dos resultados.....	48
Tabela 10 – Teor de extrativos e análise estatística dos resultados.....	48
Tabela 11 – Comparação dos componentes vegetais da biomassa sem pré-tratamento e das biomassas pré-tratadas.....	49
Tabela 12 – Resultados da análise de TG-DTA do aguapé pré-tratado com (a) ácido sulfúrico; (b) ácido acético; (c) peróxido de hidrogênio; (d) água e (e) controle – aguapé sem pré-tratamento de segunda geração.....	51
Tabela 13 – Índice de cristalinidade do aguapé pré-tratado calculado pela Equação 8.....	54
Tabela 14.1 – Quantidade de biomassa de aguapé utilizada em cada biorreator.....	57
Tabela 14.2 – Estudo estatístico dos dados da Tabela 14.1.....	58
Tabela 15.1 – Volume de etanol produzido nos processos separados e simultâneos.....	59
Tabela 15.2 – Estudo estatístico dos dados da Tabela 15.1.....	60
Tabela 16.1 – Rendimento em mL/g e g/g da produção de etanol 2G.....	63
Tabela 16.2 – Estudo estatístico dos dados da Tabela 16.1.....	64
Tabela 17 – Comparação dos resultados do rendimento com a literatura.....	66
Tabela 18.1 – Produtividade (mL/g.h) da produção de etanol 2G.....	67

Tabela 18.2 – Estudo estatístico dos dados da Tabela 18.1.....	68
Tabela 19 – Rendimento da produção etanol de diferentes matérias-primas.....	71

## 1 RESUMO

A *Eichhornia crassipes*, conhecida popularmente como aguapé, é uma macrófita aquática nativa no Brasil que tem um grande poder de adaptação e uma taxa de crescimento muito elevada, chegando a cobrir o leito de um rio em poucas semanas. Por esses motivos, atualmente, esse vegetal é considerado uma praga, pois sua grande quantidade causa danos ambientais a corpos hídricos, como a eutrofização desses habitats e no setor econômico prejudica a navegação e a produção de energia, pois se prendem aos motores e as turbinas, respectivamente. Uma alternativa para resolver o problema do excesso de aguapé é utilizar a sua biomassa para a produção de etanol de segunda geração, uma tecnologia que utiliza a celulose dos vegetais como matéria-prima. Nesta dissertação foram estudadas algumas rotas de produção, com a intenção de encontrar uma metodologia eficiente para a produção de etanol 2G a partir do aguapé. Para isso foram utilizados quatro diferentes processos químicos de pré-tratamento, auto-hidrólise, hidrólise com peróxido de hidrogênio, e hidrólise com os ácidos sulfúrico e acético, e duas formas de hidrólise enzimática, simultânea ou separada do processo de fermentação alcoólica. Pela caracterização química e pelas análises de TG-DTA, XRD e FTIR, foi possível determinar que a hidrólise com ácido sulfúrico é o pré-tratamento mais eficiente e que os processos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica simultâneas apresentam uma maior produtividade. Em um ano, com apenas um hectare, em corpos hídricos, de aguapé, é possível produzir 265 litros de etanol.

Palavras-chaves: aguapé, etanol de segunda geração, hidrolise.

RESEARCH OF BIOMASS OF *Eichhornia crassipes* (WATER HYACINTH) TO OBTAIN SECOND-GENERATION ETHANOL AS A MITIGATION PROCESS OF WATER POLLUTION.

Author: GIOVANA ROBERTA FRANCISCO BRONZATO

Adviser: ALCIDES LOPES LEÃO

Co-Adviser: IVANA CESARINO

## SUMMARY

Water hyacinth, *Eichhornia crassipes*, is a native macrophyte from Brazil that has a great ability to adapt and a very high growth rate, reaching to cover the riverbed in a few weeks. For these reasons, currently, water hyacinth is considered a pest because its large amount causes environmental damage to the rivers and lakes, such as eutrophication of these habitats, and economic sector, affecting navigation and energy production because they are arrested to engines and turbines respectively. An alternative to resolve the excess water hyacinth problem is to use its biomass to second generation ethanol production, which technology use cellulose like feedstock. In this work were studied some ways to optimize the production of 2G ethanol from water hyacinth. For this were used different chemical pre-treatment processes (hydrolysis with water, peroxide, sulfuric and acetic acids), and two way to enzymatic hydrolysis (SSF and SHF). Through the chemical characterization and TG-DTA, XRD and FTIR analyses, was possible to determine that sulfuric acid hydrolysis is the pretreatment more effective and that SSF has the bigger productivity. In one year, from one hectare covered by water hyacinth, it's possible to produce 265 liters of ethanol.

Keywords: Water hyacinth, second generation ethanol, hydrolysis



## 2 INTRODUÇÃO

A poluição dos rios é um grave problema socioambiental para o Brasil, fator que acontece principalmente pela falta de saneamento básico. Poucas cidades têm um eficiente sistema de tratamento de esgotos coletados, o que resulta em esgotos domésticos e industriais sem tratamento sendo lançados diretamente nos rios, e isso se reflete em altos valores de DBO (demanda bioquímica de oxigênio), aumento da matéria orgânica e baixos índices de qualidade de água (IBGE, 2012). Esse problema ambiental não é algo recente, pois em 1983, Romitelli escreveu sobre a necessidade de se remover nutrientes de efluentes de esgotos para minimizar a poluição nos corpos d'água. O método proposto era utilizar as *Eichornia crassipes*, nome científico do aguapé, como agente purificador desses efluentes, pois essa planta aquática tem a capacidade de absorver uma quantidade significativa de nutrientes, tem um crescimento rápido, pode ser facilmente retirada das lagoas e utilizadas posteriormente para outras finalidades (ROMITELLI, 1983).

Em 1988, Azevedo Netto escreveu um artigo explicando os “novos conceitos sobre a eutrofização”, onde também relatava os problemas causados pela presença de nutrientes nos rios por causa do despejo de efluentes urbanos, e descrevia o crescimento massivo de organismos indesejados como algas e plantas aquáticas, como as macrófitas, por causa da poluição. Ele ressaltou a importância do aguapé que consegue retirar quantidades consideráveis de fenóis e metais pesados, entretanto, causa graves problemas por ela poder aumentar de quantidade até cobrir todo o corpo hídrico, causando prejuízos para a navegação, instalações de bombeamento e turbinagens e criando ambientes favoráveis para a proliferação de mosquitos (AZEVEDO NETTO, 1988). Quando a *Eichornia crassipes* é cultivada de forma correta, ela pode ser utilizada como um

agente de despoluição, entretanto, quando esta macrófita cresce de forma descontrolada e sem manejo adequado, ela pode se transformar em um problema ambiental (MANFRINATO, 1991).

Mais de 30 anos depois desses artigos serem publicados, a situação da poluição nos rios brasileiros não foi minimizado e os problemas com a proliferação em excesso do aguapé continuaram, como foi apresentado em uma reportagem do Jornal Hoje em agosto de 2015. Na reportagem foram mostrado alguns problemas causados no rio mais poluído do Brasil, o Tietê (IBGE, 2012), pela enorme quantidade de *Eichornia crassipes* que chegou a cobrir o leito do corpo d'água, causando problemas na navegação e nas usinas hidrelétricas (JORNAL HOJE, 2015), como apresentados na Figura 1.



Figura 1 – Problemas causados pelo excesso de *Eichornia crassipes* no Rio Tietê: Cobertura do leito do rio, prejuízos para as usinas hidrelétricas e para a navegação. A cor verde da água é causada por algas.

Fonte: Reportagem do Jornal Hoje – na data de 15 de agosto de 2015

Atualmente, há estudos de tecnologias que usam o conceito “erradicação através da utilização”, que é quando não se consegue de nenhuma forma controlar ou acabar com uma praga e essa passa a ser usada como matéria prima para algum processo (PATEL; PATEL, 2015). O aguapé, por conter material lignocelulósico em sua composição, pode ser retirado dos corpos hídricos e utilizado como matéria-prima para alguns processos, como: compostagem e fertilização dos solos, componente de ração animal, fonte de energia – na forma de briquetes e na produção de biocombustíveis, como o etanol 2G (REZANIA *et.al*, 2015).

A produção do etanol de segunda geração é uma tecnologia que permite utilizar o *Eichornia crassipes* como matéria-prima, possibilitando que uma grande quantidade desta macrófita seja retirada dos rios e lagos minimizando os problemas provocados pelo excesso da mesma (DAS *et al.*, 2016).

## 2.1 Biocombustíveis

O etanol é o combustível renovável mais utilizado no setor automobilístico, sendo o Brasil e os Estados Unidos as principais potências em produção desse biocombustível. O primeiro utiliza a cana de açúcar como matéria prima e o segundo o milho, portanto, ambos utilizam áreas de plantação de alimentos para a produção de energia. Atualmente há várias tecnologias utilizadas para a produção de etanol, elas são separadas por gerações conforme foram descobertas, estudadas e geraram resultados significativos (LU; SHEAHAN; FU, 2011; PACHECO, 2011; BRASIL, 2016):

- Etanol de 1ª Geração: produzido por meio do processamento direto da matéria prima - sacarose ou amido.
- Etanol de 2ª Geração: é utilizada a biomassa lignocelulósica e para a produção é necessário a conversão, por meio químico ou biológico, da celulose em glicose;
- Etanol de 3ª Geração: produzido por meio de algas, que armazenam amido.
- Etanol de 4ª Geração: utilização de bioengenharia em organismos fotossintetizantes.

Todas essas gerações de tecnologia necessitam de mais pesquisas, inovações e investimentos. No caso do etanol de 1ª Geração o processo de produção já é

bem conhecido, entretanto há espaço para crescimento e redução de custos. Atualmente há pesquisas para desenvolver melhores, mais produtivas e resistentes variáveis de cana e com seleção de linhagens de leveduras que aumentem o rendimento da fermentação, como o aumento da tolerância do microrganismo ao álcool. No etanol 2G é necessário estudos na parte de pré-tratamento do material lignocelulósico, reduzindo custos e diminuindo a utilização de produtos químicos, e da hidrólise enzimática, principalmente para poder aproveitar a hemicelulose e assim aumentar o rendimento do processo (PACHECO, 2011).

O etanol 3G já é estudado em muitos países. No Brasil, a Embrapa começou as pesquisas em 2012. A principal vantagem em comparação aos outros dois é que elas são cultivadas em terras não agricultáveis; não é necessário que a água seja potável, pode ser salgada ou salobra; e conseguem capturar eficientes quantidades de gás carbônico. Atualmente, o grande impasse para a produção desse e do biodiesel por meio das microalgas é o econômico, entretanto, em alguns lugares há considerável investimento de cultivos em larga escala para biorrefinarias que produzem vários bioprodutos a partir da biomassa de algas (BRASIL, 2016).

A quarta geração de biocombustíveis ainda está em fase de pesquisa e desenvolvimento e a sua escala é laboratorial. Essa geração estuda melhorias por meio de engenharia genética, trabalhando com o genoma das células de organismos que fazem fotossíntese, como algumas algas e os vegetais, com o objetivo de que os organismos consumam uma maior quantidade de CO<sub>2</sub>, no processo de fotossíntese, produzindo uma quantidade maior de glicose e gerando, assim, um maior volume de biocombustíveis (LU; SHEAHAN; FU, 2011).

Com relação a produção de etanol 1G e 2G há uma projeção que o custo irá diminuir até 2030. Os responsáveis por essa diminuição no etanol 1G são: redução do preço da matéria-prima, aumento do teor de açúcar, utilização da palhada e uso do sorgo sacarino. Para o etanol 2G os itens que atuam sobre o custo são: a redução do custo da matéria-prima, o aumento da eficiência na indústria e um avanço no processo industrial (JONKER *et al.*, 2015).

O Brasil tem potencial para aumentar ainda mais a produção deste combustível renovável no futuro, com ajuda de novas tecnologias, que proporcionam uma expansão do cultivo por área, uma melhoria do rendimento agrícola e nas usinas e a

introdução de novas vias de processamento industrial para os processos de primeira e a segunda geração do etanol (JONKER *et al.*, 2015).

## 2.2 Etanol de Segunda Geração

No Brasil há duas principais formas de produção de combustíveis para automóveis, refinamento do petróleo e destilação de caldo de cana fermentado. Para a produção da gasolina e do óleo diesel, hidrocarbonetos que, ao serem queimados, liberam gás carbônico, o petróleo é submetido a uma sequência de processos. Destilação, para que sejam separados os compostos, dependendo das faixas de ebulição de cada fração; processo de conversão, etapa de natureza química, que visa transformar uma fração em outra, ou alterar a constituição molecular de uma dada fração para melhorar a sua qualidade, um destes processos de conversão é denominado de craqueamento catalítico, pois ocorre na presença de um catalisador; a última etapa é conhecida como processos de tratamento, que tem por finalidade eliminar as impurezas presentes nas frações para que o produto acabado tenha estabilidade química, estes procedimentos podem ser classificados em convencionais, aplicados às frações leves, e hidroprocessamento, utilizado nas frações médias e pesadas (PETROBRAS, 2002; UNICA, 2007; OLIVEIRA, 2012).

A cana-de-açúcar é utilizada como matéria prima para a produção do álcool combustível, o etanol. Esse vegetal é moído para a obtenção de um caldo que será fermentado e, posteriormente, destilado. O etanol é também classificado como um biocombustível, pois além de utilizar uma matéria-prima renovável, a mesma consome gás carbônico durante a fotossíntese, balanceando com a liberação de CO<sub>2</sub> pela queima do combustível (PETROBRAS, 2002; UNICA, 2007; OLIVEIRA, 2012). O etanol também pode ser obtido a partir de amido; normalmente, o milho é utilizado, mas também podem ser usados outros grãos, ou tubérculos, como a beterraba. Esse tipo de processo é dominado pelos EUA, seguido por outros países como China, Canadá, França, Alemanha e Suécia (LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014).

Comparando as duas tecnologias para a produção do etanol, a brasileira, que utiliza a cana-de-açúcar é mais simples que a utilizada pelos EUA, que usam o milho como matéria prima. Na metodologia que utiliza o amido como fonte de glicose, o milho precisa ser moído e, subsequentemente, é realizada a liquefação do amido, que é

acompanhada pelo processo de sacarificação, ou de hidrólise. Esse processo tem a intenção de liberar o açúcar. Essa solução é fermentada por leveduras, e depois destilada. (LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014).

A cana-de-açúcar é uma planta fina, de formato cilíndrico, que possui folhas grandes. Após a planta ser colhida, de forma manual ou automatizada, e processada nas moendas, há produção de subprodutos: a palha e o bagaço, que podem ser utilizados para a co-geração de energia, sendo queimadas nas caldeiras. Atualmente, uma parte desses materiais pode ser utilizada como matéria prima para a produção de etanol de segunda geração (OLIVEIRA, 2012). A Figura 2 representa um esquema da produção de etanol de 1ª e 2ª geração.

Para a produção de etanol de segunda geração podem ser utilizados diferentes tipos de material lignocelulósico como substrato, porém o processo ainda encontra-se limitado por desafios econômicos, principalmente pelo custo das enzimas utilizadas na produção do biocombustível (LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014). Alguns exemplos de biomassa lignocelulósica usadas na produção de etanol de segunda geração são colza (canola), palha de milho e de trigo, cavaco de pinho, capim elefante, entre outras (SANTOS *et al.*, 2012; COTANA *et al.*, 2014; LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014; LÓPEZ-LINARES *et al.*, 2014).

## Produção de Etanol – 1ª e 2ª Geração

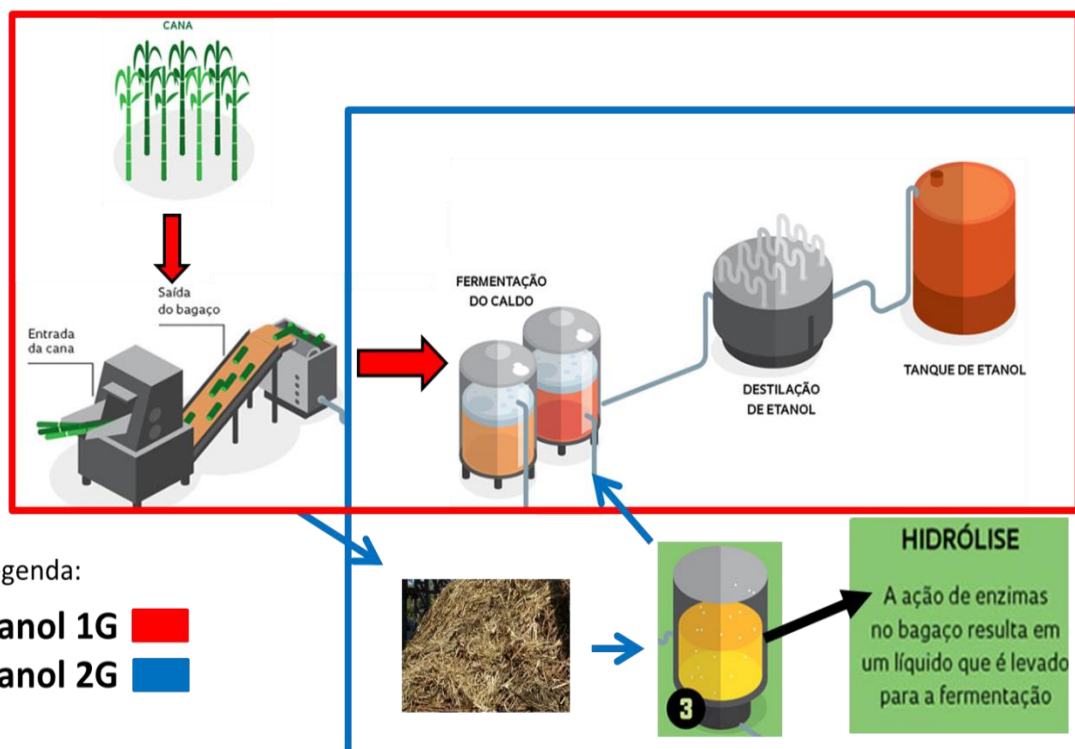


Figura 2 – Esquema da produção de Etanol de 1º e 2º Geração. O retângulo e as setas vermelhas indicam o processo para a produção do etanol de primeira geração – moagem da cana, fermentação do caldo e destilação do mosto fermentado. O retângulo e as setas azuis indicam a produção de etanol de segunda geração, que pode ser dividida em cinco etapas: moagem da biomassa, pré-tratamento da biomassa, hidrólise enzimática, fermentação do caldo e destilação do mosto fermentado.

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2012

Na tecnologia para a produção de etanol de segunda geração há duas principais etapas: o pré-tratamento da biomassa e a hidrólise enzimática. O processo de pré-tratamento tem o objetivo de preparar a biomassa para a etapa de hidrólise enzimática, expandindo as suas fibras e rompendo e solubilizando os componentes do complexo lignina-hemicelulose-celulose que possam atrapalhar a atuação das enzimas nas fibras. A etapa da hidrólise enzimática é responsável por hidrolisar a celulose em glicose, para que possa ocorrer a fermentação na etapa posterior. Para a produção de etanol 2G um desafio é determinar qual o melhor pré-tratamento, em eficiência e custo, para matérias-primas variadas, pois cada uma tem diferentes porcentagens de lignina, celulose e

hemicelulose em suas estruturas (SUN; CHENG, 2002; PACHECO, 2011; COTANA *et al.*, 2014).

### 2.2.1 Biomassa Lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é o recurso biológico renovável mais abundante da terra. Ela é formada por lignina, hemicelulose e celulose, esses três componentes fazem parte da parede celular das plantas, conforme apresentado na Figura 3. As fibras vegetais são constituídas por fibrilas de celulose mantidas coesas por uma matriz formada por lignina e hemicelulose, que tem as funções de barreira natural contra a degradação microbiana e de proteção mecânica (SILVA *et al.*, 2009).

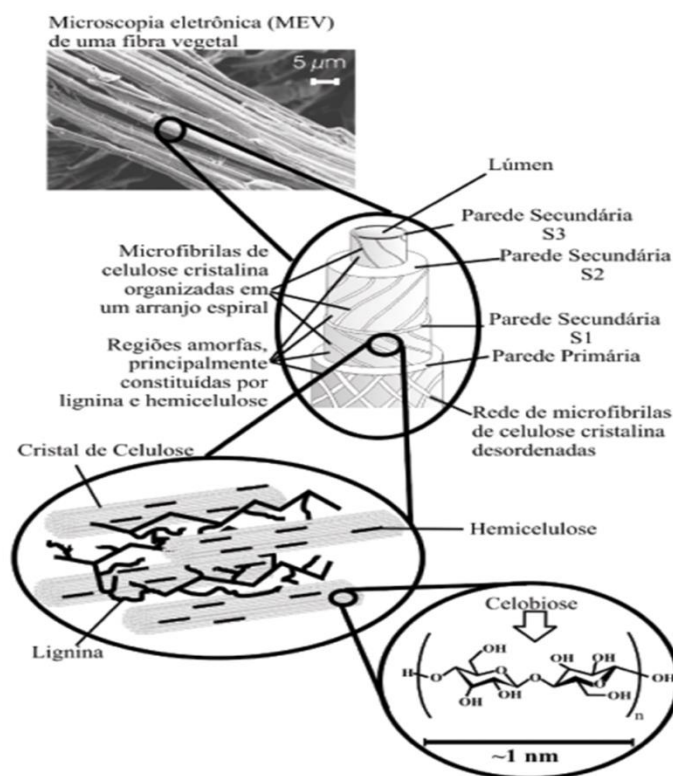


Figura 3 – Material lignocelulósico em uma célula vegetal. A disposição concêntrica das camadas da parede celular vegetal é causada pelas diferenças na composição química e pela diferentes orientações dos elementos estruturais. Os componentes podem ser subdivididos em duas categorias: estrutural – a celulose; e sub-estrutural – polioses e lignina. Quando a lignina e a poliose são removidas é possível ver as celuloses, também chamada de fibra (FENGEL, 1989).

Fonte: (SILVA *et al.*, 2009)



A composição química da madeira é distribuída entre macro e micromoléculas. As macromoléculas são a celulose, poliose (hemicelulose) e lignina, e estão presentes em todas as madeiras. As micromoléculas, que são encontradas em menores quantidades, são os extrativos e minerais. As proporções e a composição química da lignina e das polioses variam dependendo do tipo da madeira, entretanto a celulose é um componente uniforme em todos os vegetais (FENGEL, 1989). Um esquema geral dos componentes químicos dos vegetais é apresentado na Figura 4.

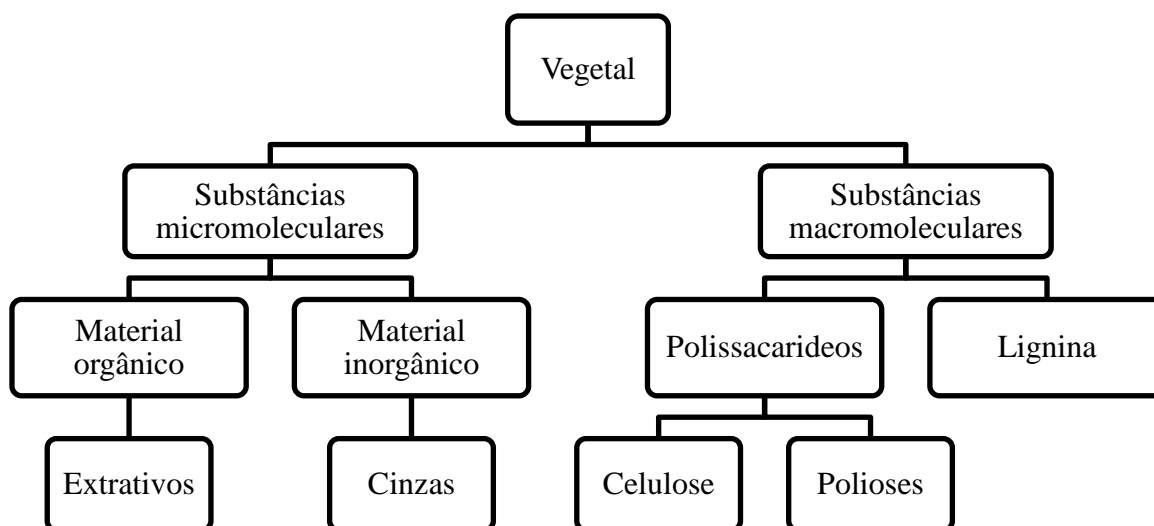


Figura 4 – Esquema geral dos componentes químicos de um vegetal.

Fonte: Adaptado de FENGEL (1989)

### 2.2.2 Celulose

Esse componente estrutural é um biopolímero formado por muitas unidades repetidas de celobiose, e esta é composta por duas moléculas de glicoses ligadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. As glicoses contêm grupos hidroxilas que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Essas ligações de hidrogênio permitem que a celulose tenha uma estrutura cristalina que a torna insolúvel em

água e na maioria dos solventes (FENGEL, 1989). A Figura 5 mostra representações da celulose.

Feixes de moléculas desse biopolímero se agregam na forma de microfibrilas, que são compostas por regiões altamente ordenadas (cristalinas), alternadas com regiões amorfas, que são menos ordenadas. As microfibrilas compõem as fibrilas e estas formam as fibras celulósicas, ou seja, as fibras de celulose são formadas por várias moléculas de celulose. Estas moléculas de celulose variam em tamanho entre si (KLOCK *et al.*, 2005).

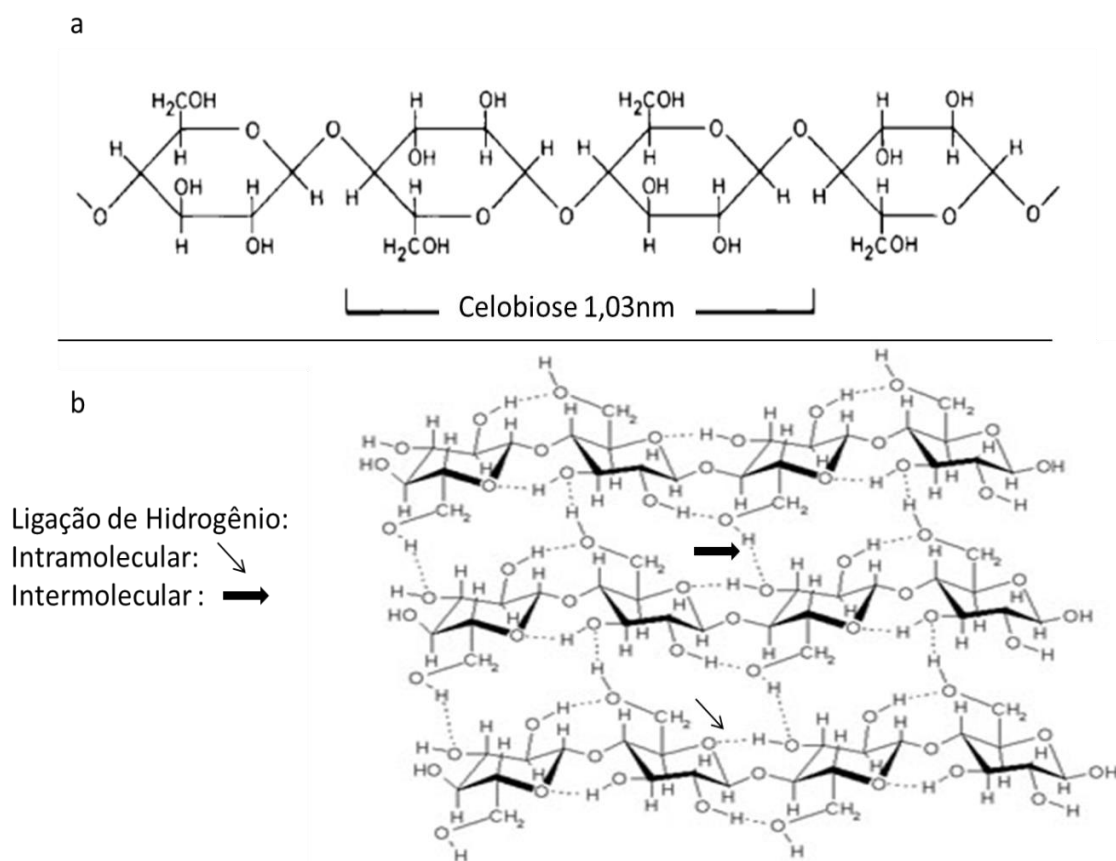


Figura 5 – Representações da celulose. **a**- Uma parte da celulose, destacando uma molécula de celbiose. **b**- Uma parte da molécula de celulose, destacando as ligações de hidrogênio: ↘ indica uma ligação intramolecular e → indica uma ligação intermolecular.

Fonte: **a** – Adaptado de FENGEL (1989); **b** – Adaptado de SANTOS (2012)

O comprimento da cadeia é expresso em grau de polimerização (GP) – é a massa molecular da celulose dividida pela massa molecular de uma unidade glicosídica. O GP da celulose varia de 1000 a 15000. Esse valor pode variar dependendo da metodologia para a determinação do GP, da origem da celulose e também da degradação da amostra (KLOCK *et al.*, 2005).

A nomenclatura da celulose pode variar dependendo da origem e das características da mesma. A celulose nativa é chamada de celulose tipo I, por causa da sua estrutura cristalina e tem um GP no intervalo de 3500 a 12000. Tratamentos químicos afetam as propriedades da celulose e produzem os outros tipos de celulose que diferem entre si no grau de cristalinidade: celulose II, celulose III, celulose IV e celulose V. (FENGEL, 1989; KLOCK *et al.*, 2005).

Conforme a solubilidade da celulose a sua nomenclatura também muda. Quando isolada, por meio de algum método químico, é chamada de alfa-celulose. Entretanto, nenhuma metodologia permite que seja obtido esse componente vegetal em sua forma pura e a alfa-celulose é insolúvel em meio alcalino. A beta-celulose é a porção da celulose solúvel em uma solução alcalina, porém ela precipita quando a solução é neutralizada. A parte da celulose que continua solúvel na solução neutralizada é a gama-celulose (FENGEL, 1989).

### **2.2.3 Hemicelulose**

A hemicelulose, ou poliose, é um heteropolissacarídeo complexo compostos por vários açúcares de baixa massa molecular, como: xilose, arabinose, glucomanose, manose, glicose, ácido glucourônico, entre outros. A Figura 6 apresenta alguns açúcares presentes na hemicelulose. As proporções desses açúcares variam dependendo da espécie do vegetal. As polioses são diferentes da celulose pois além de serem compostas de várias unidades de açúcar, elas tem cadeias moleculares mais curtas, um alto grau de ramificação em sua cadeia e apresentam um grau de polimerização menor (FENGEL, 1989; KLOCK *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2009).

As polioses não apresentam regiões cristalinas, tendo uma característica amorfa, por esse motivo reagem mais facilmente que a celulose com substâncias químicas e elas são hidrofílicas (KLOCK *et al.*, 2005).

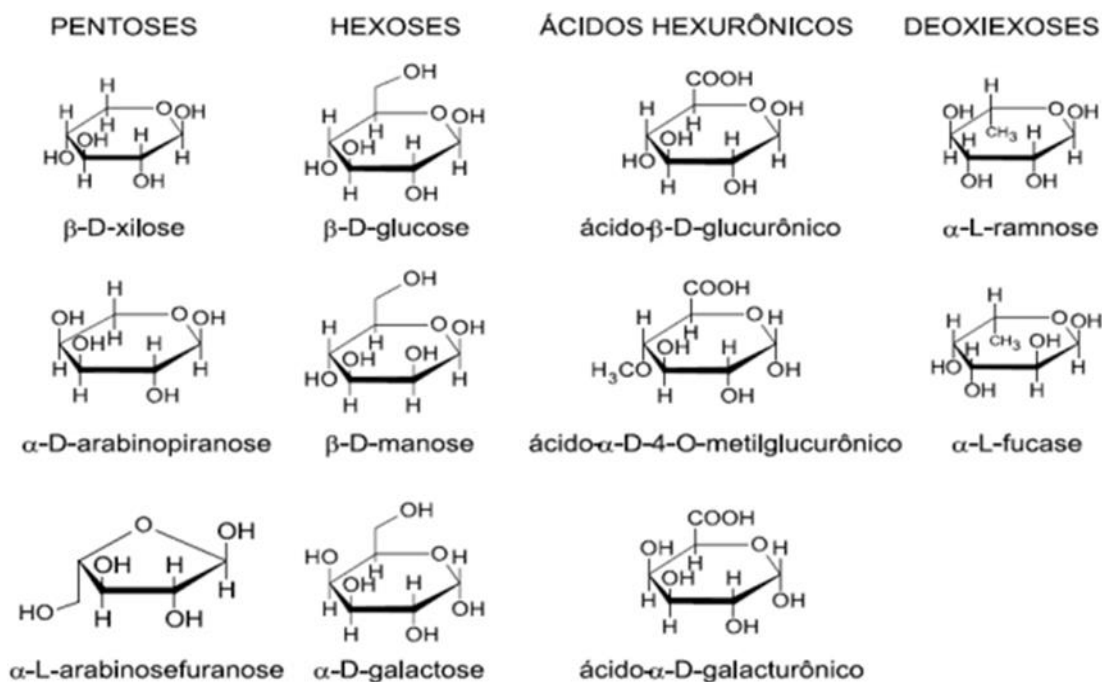


Figura 6 – Polissacarídeos encontrados na hemicelulose

Fonte: Adaptada de FENGEL (1989)

### 2.2.4 Lignina

Na madeira livre de extrativos, as ligninas representam a fração não-carboidrato. Elas são um heteropolímero amorfo, compostas por três diferentes unidades de fenilpropanos: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Sua composição pode variar conforme a origem e a espécie do vegetal, por isso são extremamente complexas e de difícil caracterização. Não é possível remover da estrutura do vegetal esse componente sem uma considerável degradação. A lignina é ligada quimicamente às polioses (KLOCK *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012). Na Figura 7 é mostrada uma possível molécula de lignina e seus precursores primários.

Em comparação com a celulose, além da diferença na sua composição, a lignina não é encontrada em todas as plantas, sendo formada apenas em plantas vasculares que desenvolvem tecidos com as funções de transporte de soluções aquosas e suporte mecânico. Assim, a lignina funciona como um elemento estrutural, de

suporte das plantas, como um agente enrijecedor no interior das fibras. Esse polímero tem um baixo grau de polimerização, na faixa de 5 a 60 (KLOCK *et al.*, 2005).

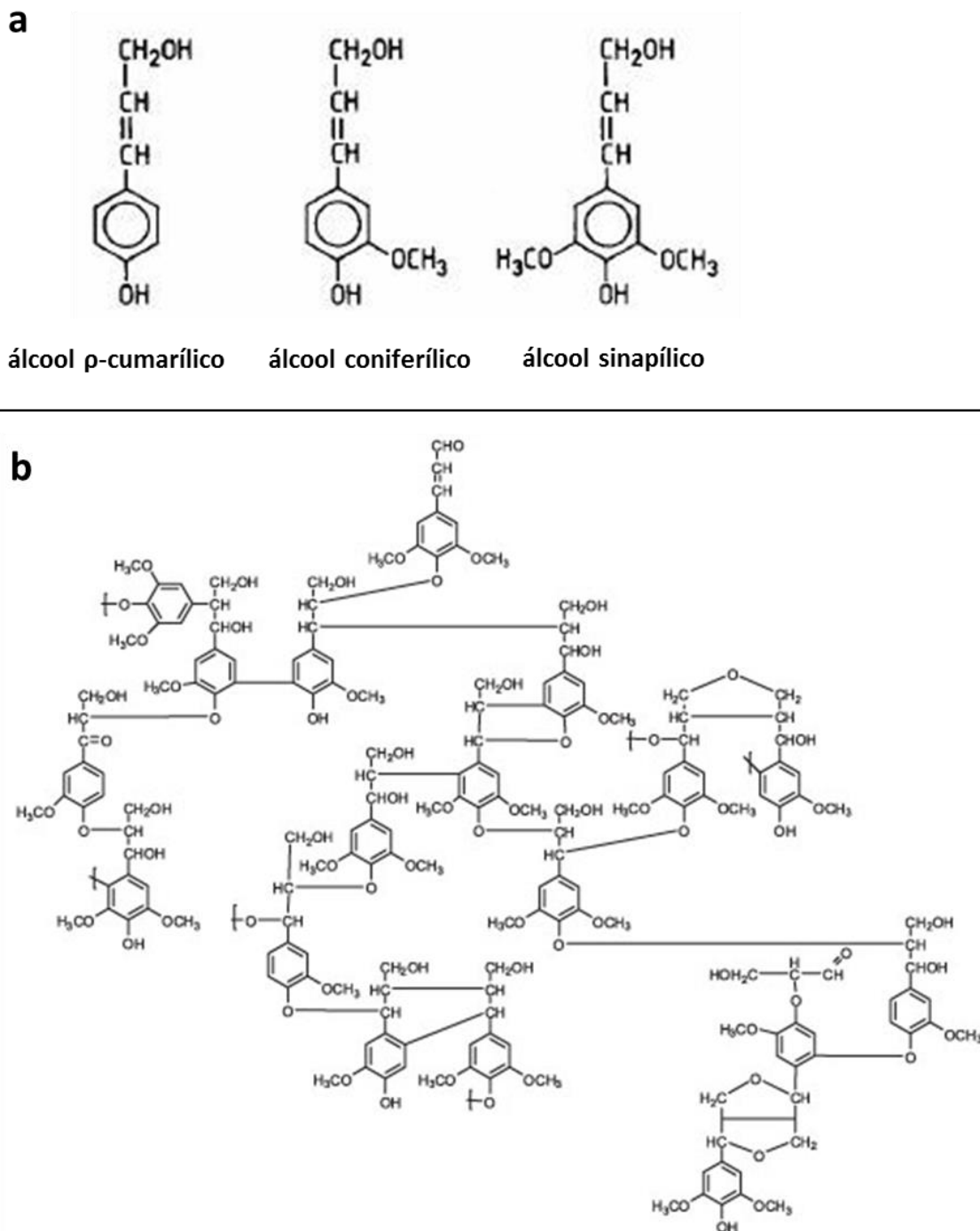


Figura 7 – Representações da lignina. **a-** Precursores primários da lignina. **b-** Molécula de lignina de uma conífera, simulação de possíveis ligações e da estrutura.

Fonte: Adaptado de FENGEL (1989)

### 2.2.5 Pré-tratamento da Biomassa

Para a produção do etanol de segunda geração é necessário que a celulose esteja livre para a enzima poder quebrá-la em glicose, por isso é necessário um tratamento nas fibras que separe a hemicelulose e a lignina do biopolímero principal. A Figura 4 esquematiza esse processo.

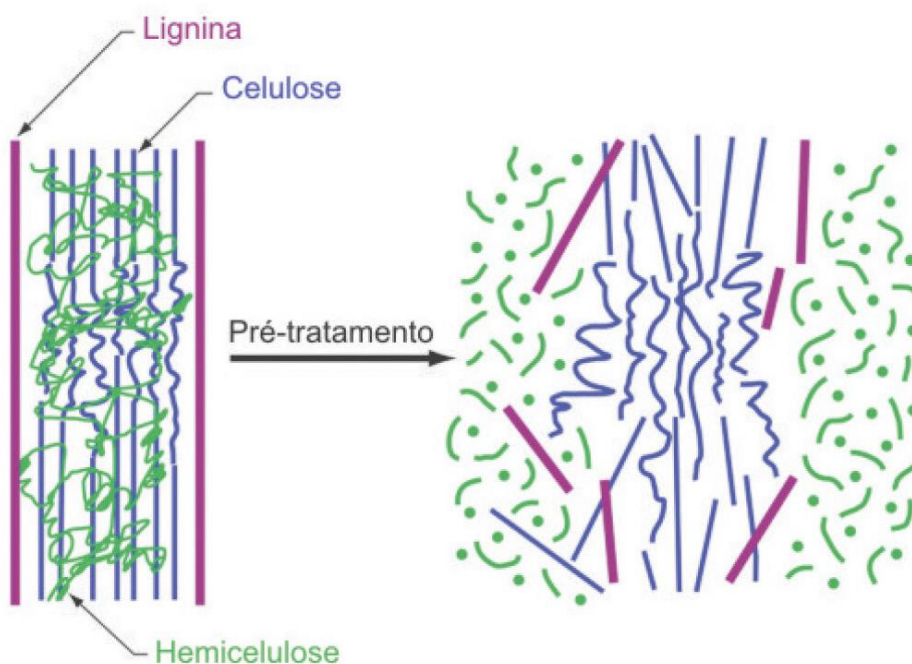


Figura 8 – Pré-tratamento da biomassa  
Fonte: (SANTOS *et al.*, 2012)

O método utilizado no pré-tratamento depende de cada biomassa e das proporções do complexo lignina-celulose-hemicelulose, por isso há vários métodos possíveis que podem ser classificados em: físicos, químicos, biológicos ou ainda uma combinação entre eles (SANTOS *et al.*, 2012). A Tabela 1 apresenta alguns pré-tratamentos, suas características, vantagens e desvantagens. Para um pré-tratamento ser eficaz e economicamente viável ele precisa: produzir fibras de celulose para o ataque enzimático; evitar a destruição da hemicelulose e da celulose; evitar a formação de possíveis inibidores de enzimas hidrolíticas e microrganismos fermentadores; minimizar o gasto de energia; diminuir o custo do processo de redução de tamanho da matéria prima; produzir poucos resíduos; consumir pouco ou nenhum insumo químico e utilizar pouca quantidade de água (TAHERZADEH; KARIMI, 2008)

Tabela 1 – Características de algumas categorias de pré-tratamentos: físico, químico, biológico e combinado.

Pré-tratamentos	Características composicionais			Vantagens	Desvantagens	
	Celulose	Hemicelulose	Lignina			
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau da cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução de cristalinidade	Alto consumo de energia
	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Condições médias, alta produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
Químico	Hidróxido de sódio	Inchação significativa	Considerável solubilidade	Considerável solubilização, >50%	Remoção efetiva de ésteres	Reagente de alto custo, recuperação alcalina
	Organo-solv	Considerável inchação	Solubilização quase completa	Solubilização quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente, alto custo
Biológico	Micro biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	Aproximadamente 40% de deslignificação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise
Combinado	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório

Fonte: Adaptado de (SANTOS *et al.*, 2012)

### 2.2.6 – Pré-tratamento Físico

Este pré-tratamento utiliza métodos físicos para diminuir o grau de cristalinidade e de polimerização da celulose, aumentando a área de superfície acessível a esse polímero. Para a realização deste pré-tratamento podem ser utilizados vários métodos como a moagem e a irradiação. Para a moagem podem ser utilizados moinhos de bola, de martelo, de dois rolos e de facas. E para a irradiação tem-se raios gama, feixes de elétrons ou micro-ondas. Nestes processos não há remoção da lignina e da celulose. Para esse pré-

tratamento, normalmente há um alto consumo de energia (SANTOS *et al.*, 2012; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

### 2.2.7 – Pré-tratamento Químico

Para este pré-tratamento é utilizada uma substância química para a abertura da fibra e para solubilizar a hemicelulose e a lignina. Cada substância química reage de uma forma diferente com a biomassa, entretanto em quase todos os casos há a necessidade de se recuperar o reagente (SANTOS *et al.*, 2012). No pré-tratamento alcalino podem ser utilizadas soluções básicas como hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, amônia, entre outras, para a remoção da lignina e de parte da hemicelulose, aumentando a acessibilidade da enzima à celulose. Podem ser realizados a baixas temperaturas, mas com longo período de tempo e elevada concentração da solução alcalina. Esse tratamento consegue romper ligações ésteres entre o complexo lignina-hemicelulose-celulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; SANTOS *et al.*, 2012).

Soluções de peróxido de hidrogênio conseguem deslignificar a biomassa lignocelulósica por meio da oxidação da lignina por íons, como o ânion hidroperóxido e em hidroxila e superóxido, que são formados com a decomposição do peróxido. Esse mecanismo também consegue degradar a hemicelulose, entretanto, para o processo ser eficiente, o meio reacionário necessita ser alcalino (GOULD, 1985).

O pré-tratamento ácido utiliza soluções como ácido acético, ácido clorídrico, ácido nítrico, entre outros, como reagente para a hidrólise da biomassa, sendo o ácido sulfúrico o mais utilizado. O ácido reage com a celulose desfazendo a estrutura cristalina, fazendo com que a celulose passe ao estado amorfo. Ácidos fortes geram melhores resultados na quebra do complexo lignocelulósico que ácidos fracos, entretanto são mais tóxicos e a sua recuperação é mais complexa. Há duas formas de realizar esse tratamento: pré-tratamento com ácido concentrado (temperatura baixa e alta concentração do ácido); e pré-tratamento com ácido diluído (alta temperatura e baixa concentração do ácido) (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; SATYANAGALAK SHMI *et al.*, 2011)



### 2.2.8 Pré-tratamento Biológico

Nesta forma de pré-tratamento não há utilização de substâncias químicas; ao invés, é utilizado um microrganismo, como fungos, ou enzimas para degradar a matéria lignocelulósica. As enzimas mais utilizadas são as celulases, que são complexos capazes de hidrolisar material celulósico. Para essa metodologia é necessário um alto controle das variáveis, como pH e temperatura, entretanto em comparação com a hidrólise química essa ocorre em condições mais brandas de pressão e temperatura. Outra vantagem é o alto grau de especificidade na degradação o que elimina a produção de substâncias tóxicas para a posterior fermentação. Entretanto, essas tecnologias, como a produção de enzimas e o uso delas na produção de etanol, ainda estão em desenvolvimento. Atualmente o custo de um complexo enzimático é muito alto, o que torna a utilização dele na produção de etanol lignocelulósico inviável economicamente (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

### 2.2.9 Pré-tratamento Combinado

A explosão a vapor é um processo de pré-tratamento combinado, pois atua tanto física como quimicamente na estrutura do material lignocelulósico. O processo é baseado no contato direto da biomassa com o vapor saturado à alta pressão por um tempo determinado, em um ambiente fechado, como um reator, seguido de uma descompressão rápida à condição atmosférica, o que caracteriza a explosão. Durante o processo, as ligações químicas que mantêm a lignina, hemicelulose e celulose fortemente associadas são em partes quebradas, assim, no momento que há a explosão o material é desfibrado com facilidade e as partículas são reduzidas de tamanho, resultando num aumento da área superficial de contato e diminuindo a resistência da parede celular à sacarificação. Quando esse processo é realizado apenas com água e biomassa, ele é denominado de auto-hidrólise. A explosão a vapor também pode ser utilizada em conjunto com o pré-tratamento ácido ou alcalino (PITARELO *et al.*, 2012).

Na auto-hidrólise, a eficácia do pré-tratamento depende principalmente de três fatores: temperatura, tempo de resistência e teor de umidade da biomassa. Para maiores valores de sacarificação da celulose, normalmente, são utilizados processos drásticos, com temperatura e tempo elevado, entretanto, isso causa uma grande

decomposição da celulose e da hemicelulose e há condensação da lignina o que promove o acúmulo de inibidores no meio de reação (PITARELO *et al.*, 2012).

### 2.2.10 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática é o processo bioquímico que degrada a celulose, hidrolisada na etapa de pré-tratamento, em glicose que será fermentada pelas leveduras. Esse processo é realizado por um complexo enzimático: a celulase. A Figura 9 representa um esquema da atuação dessas enzimas.

A celulase é constituída por três enzimas que atuam sinergicamente, sendo o produto de uma o substrato da outra:

- Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase ou endoglucanase: é responsável pela quebra das ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais;
- Exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase ou celobio-hidrolase: essa enzima atua nos terminais produzindo a celubiose;
- 1,4- $\beta$ -D-glucosidase: ela termina o processo, hidrolisando a celubiose em glicose (OGEDA; PETRI, 2010).

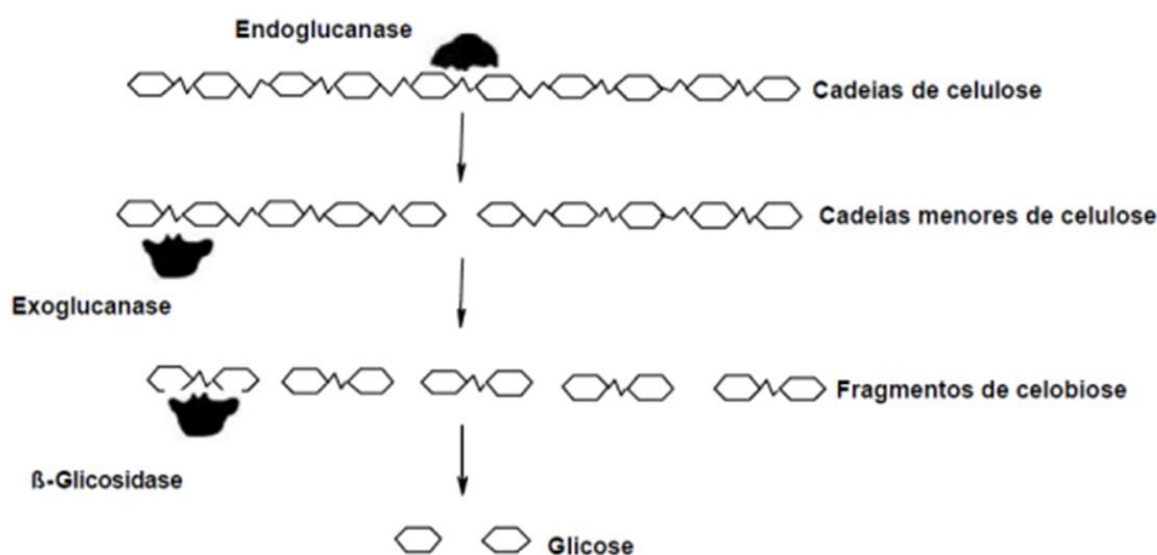


Figura 9 – Atuação do complexo enzimático: celulase

Fonte: (ZANCHETTA, 2013)

Enzimas são altamente específicas e necessitam de características bem controladas para conseguirem o melhor desempenho. Geralmente, o pH ótimo para a atuação da celulase é na faixa de 3,5 – 5,0 e a temperatura ótima é em torno de 40°C

(CASTRO; PEREIRA, 2010). Um problema desse complexo enzimático é a formação de compostos inibidores, pois a celulase é inibida na presença de celubiose e de glicose (SUN; CHENG, 2002).

### 2.2.11 Fermentação Alcoólica

Fermentação alcoólica é um fenômeno bioquímico realizado por alguns microrganismos como a *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura que, em condições anaeróbicas, metaboliza a glicose em etanol e gás carbônico para obtenção de energia (ATP). A Figura 10 mostra um esquema desse processo. De uma forma geral, por meio de reações catalisadas por enzimas a molécula de glicose é degradada em duas moléculas de piruvato, e essa molécula é convertida em etanol e gás carbônico (NELSON; COX, 2002). Os parâmetros ótimos para a levedura apresentar o seu melhor desempenho é a temperatura, no intervalo de 28°C a 35°C, e o pH entre 3,5 e 6,0 (BAYRAKCI; KOÇAR, 2014).

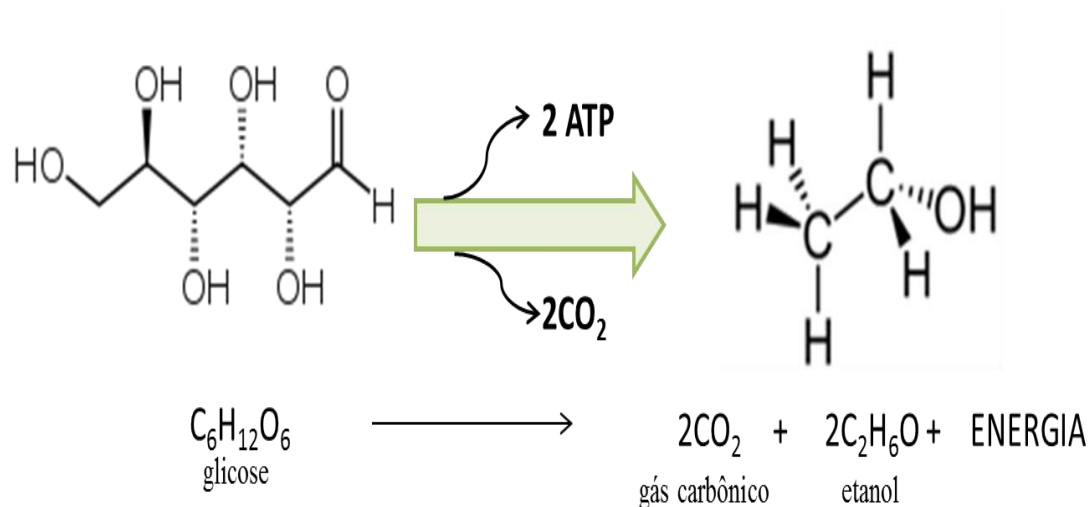


Figura 10 – Esquema da fermentação alcoólica

O substrato utilizado na fermentação para produção de etanol 2G é a glicose hidrolisada pelas enzimas do complexo celulase. Há duas maneiras de se realizar esse processo. A primeira é o método mais antigo, onde é feito primeiro a hidrólise enzimática e depois a fermentação alcoólica. A segunda maneira é com os dois processos ocorrendo simultaneamente no mesmo biorreator (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

No método chamado de hidrólise e fermentação separadas (SHF) os processos são feitos de forma sequencial: primeiro a hidrólise enzimática e depois a fermentação alcoólica. A principal vantagem desse processo é que as etapas serão conduzidas em suas condições ótimas (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

No processo conhecido como hidrólise e fermentação simultâneas (SSF) a hidrólise enzimática e a fermentação alcoólica acontecem no mesmo biorreator, ou seja, simultaneamente. Essa é uma metodologia utilizada para diminuir o problema da inibição da celulase, pois os açúcares são consumidos antes de acumularem no biorreator. Os parâmetros utilizados nessa metodologia são intermediários entre os parâmetros ótimos da enzima e da levedura, por isso a temperatura utilizada é aproximadamente 38°C (SUN; CHENG, 2002).

Em comparação com a hidrólise e fermentação separada a simultânea tem as seguintes vantagens:

- Aumento da taxa da hidrólise enzimática;
- Menor utilização de enzima;
- Maior rendimento do produto;
- Menor necessidade de condições estéril;
- Menor tempo de processo;
- Necessidade de apenas um reator.

Entretanto, nesse processo o etanol pode causar uma inibição na celulase (SUN; CHENG, 2002).

### **2.3 Futuro da Tecnologia de Produção do Etanol**

Atualmente, com vários problemas como as mudanças climáticas, a competição do solo para outras culturas, a necessidade de utilizar solos menos férteis ou degradados, o Brasil precisa promover um crescimento adequado da produção de cana de açúcar para poder atender a necessidade do mercado interno e externo que estão em contínua expansão. A produção da cana no país começou em direção às regiões mais propícias climaticamente a sua adaptação. Entretanto, hoje essa expansão passou para regiões com climas não tão favoráveis para o crescimento dessa planta, portanto são necessários esforços tecnológicos para se desenvolver variedades que se adaptem ao solo e às novas condições climáticas. O setor sucroalcooleiro brasileiro possui grandes instituições de pesquisas que foram e são responsáveis pelos principais avanços no

desenvolvimento de variedades, inovação e desenvolvimento no setor: Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA). As novas variedades devem ser mais produtivas, ser mais resistentes a pragas, consumir menos insumos e ser mais adaptadas ao ciclo sazonal e suportar a mecanização. Em 30 anos, o melhoramento genético de cana de açúcar no Brasil aumentou 30%, o que em comparação com outras culturas, mostra ser essa porcentagem modesta (CARVALHO; FURTADO, 2013).

As enzimas são uma importante área de pesquisa para o melhoramento da eficiência e redução do custo da produção de etanol. Atualmente, elas são empregadas na fabricação do etanol de milho, para extrair os açúcares dos amidos, e no processo de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. No primeiro caso a biomassa onde a enzima irá atuar pode ser dissolvida em água, formando uma solução na qual essas proteínas específicas agem facilmente. No segundo, as matérias primas para a produção do etanol de segunda geração são sólidas e não solúveis em água, portanto as enzimas precisam atuar em uma interação entre sólido e líquido, e isso torna o processo mais complexo (EMBRAPA, 2014).

Há várias etapas quando se pesquisa enzimas e o processo pode levar muitos anos até ela ser um produto comercial. De modo simplificado o primeiro passo é identificar o potencial de um grupo de enzimas; o segundo é fazer com que um único microrganismo produza todas as enzimas com a maior eficiência possível; e por último, conseguir a mesma eficiência em escala industrial. Todos esses fatores fazem com que o preço das enzimas seja alto, o que encarece a produção do etanol 2G. Aparentemente, o desenvolvimento tecnológico já conseguiu reduzir o custo em aproximadamente 15% em comparação com o início dos anos 2000. E isso reflete nas instalações de plantas industriais para a produção do etanol lignocelulósico (EMBRAPA, 2014).

Uma forma de tentar baratear o custo das enzimas para o processo é a reutilização das mesmas, e com isso abre-se uma nova linha de pesquisa: a imobilização das enzimas. Em seu formato original as enzimas são solúveis em água e descartadas com ela no fim do processo. Essa nova técnica permite acoplar a enzima a uma molécula que possa ser retida por meio de uma filtração, ou por meio de outro método de separação, antes do descarte dos efluentes. Entretanto, o processo para imobilizar a enzima também

tem um custo, por isso é necessário mais pesquisas para torná-lo economicamente viável (EMBRAPA, 2014).

Uma outra linha de pesquisa é a produção de enzimas para a degradação da hemicelulose em açúcares fermentescíveis. Há estudos que propõem uma hidrólise utilizando a xilana como matéria-prima, que é convertida em xilose e depois em xilulose, e esta molécula é fermentada no tanque junto com a glicose. Esse processo visa aumentar a quantidade de açúcares obtidos da biomassa disponível para a fermentação (EMBRAPA, 2014).

Há estudos que propõem o uso de outras matérias-primas, além da cana-de-açúcar, para a produção de etanol devido ao potencial de rendimento, composição, e tolerância às condições climáticas dessas plantas. A produção de etanol 2G é a que mais permite a utilização de outras fontes de biomassa, como a cana-energia (ou cana-fibra) que é uma cana de açúcar modificada geneticamente com o intuito de produzir mais fibra que sacarose, sorgo sacarino, capim elefante e eucalipto (JONKER *et al.*, 2015; BRESSIANI, 2016).

Outra possibilidade é a utilização de biomassas não usuais para a produção de etanol 2G, como o aguapé. Como essa planta é considerada uma praga aquática, a utilização dela como matéria prima para a produção de etanol não é apenas uma opção para aumentar o volume de produção deste biocombustível, mas sim uma forma de resolver um problema de ordem ambiental e econômica. Além disso, pesquisas com biomassas alternativas podem ajudar a diminuir o custo da produção do etanol lignocelulósico e explorar a viabilidade em escala comercial (PATEL; PATEL, 2015).

#### **2.4 *Eichornia crassipes* – Aguapé**

A *Eichornia crassipes* no Brasil é chamada popularmente de aguapé ou jacinto d'água (AZEVEDO NETTO, 1988). Esta macrófita aquática é uma monocotiledônea de água doce pertencente à família das *Ponteriaceae* e é um vegetal nativo do Brasil e da região equatorial. Ela é utilizada como flor ornamental, encontrada em lagos e aquários, pois tem uma flor lilás (GANGULY; CHATTERJEE; DEY, 2012). Essa macrófita aquática tem aproximadamente de 30 a 40 cm de comprimento, com folhas arredondadas e com raízes adventícias longas e fibrosas, é classificada como flutuante e tem uma alta capacidade para descontaminar águas poluídas (ROMITELLI, 1983;

AZEVEDO NETTO, 1988; MAHMOOD *et al.*, 2005; GONÇALVES JR.; SELZLEIN; NACKE, 2009).

Uma característica morfológica desta espécie é que a epiderme dela é composta por uma camada de células retangulares (circular para hexagonal), que conseguem absorver nutriente e gases diretamente da água. A parte anatômica mais relevante deste vegetal é a presença de câmaras de ar<sup>1</sup> e as passagens de gás nos rizomas, folhas e raízes. Essas câmaras são grandes, normalmente regulares, com uma forma de circular para hexagonal, e proporcionam uma espécie de atmosfera interna para as plantas, além de fazê-las flutuarem (MAHMOOD *et al.*, 2005). Na Figura 11 há *Eichornia crassipes* nas margens do Rio Tietê e a Figura 12 tem-se uma unidade de aguapé cortado ao meio.



Figura 11 – Aguapé no Rio Tietê na cidade de São Manuel

Fonte: Acervo pessoal Giovana Bronzato

---

<sup>1</sup> Similares a um vacúolo, entretanto, não estão dentro de uma célula. A estrutura formada por essas câmaras de ar é semelhante a encontrada em esponjas utilizadas para limpeza (Nota do autor).

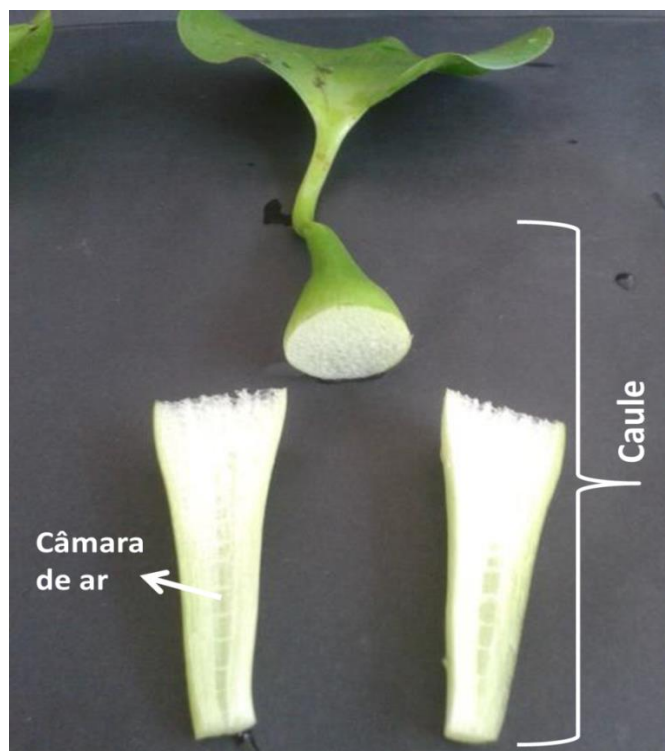


Figura 12 – Corte de uma unidade de aguapé. Em destaque uma câmara de ar.

Fonte: Acervo pessoal Giovana Bronzato

Uma das características da *Eichornia crassipes* é que ela consegue assimilar determinadas substâncias, incorporando-as à sua massa. Entretanto, essa capacidade pode saturar e se as plantas não forem recolhidas essas substâncias voltam para a água com a decomposição do aguapé (AZEVEDO NETTO, 1988). Por causa dessa característica, ele consegue remover metais pesados de corpos hídricos e, portanto é utilizado para fitorremediação, que é o uso de sistemas vegetais e de sua microbiota para remover, degradar ou isolar substâncias tóxicas do ambiente. Essa propriedade continua mesmo quando a biomassa do aguapé é seca (GONÇALVES JR; SELZLEIN; NACKE, 2009).

O aguapé, em sua constituição apresenta um maior teor de água em comparação com a sua matéria seca: esse valor é superior a 90%. A caracterização química da sua biomassa seca é composta por aproximadamente de 25% de celulose, 35% de hemicelulose, 10% de lignina, 25% de cinzas. O valor das cinzas é alto por causa da propriedade desta planta de retirar substâncias dos corpos hídricos como os metais pesados (GANGULY; CHATTERJEE; DEY, 2012; REZANIA *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2016).

A reprodução da *Eichornia crassipes* acontece pelos dois métodos, assexuada (multiplicação vegetativa) e sexuada (por meio de sementes), o que dificulta o



controle do crescimento deste vegetal (GANGULY; CHATTERJEE; DEY, 2012). A sua taxa de crescimento tem um valor muito elevado, 220 kg/ha/dia (BAYRAKCI; KOÇAR, 2014). Essa rápida taxa de crescimento, junto com a capacidade de competir com outras plantas aquáticas e sua facilidade de adaptação tornam o aguapé uma das plantas mais invasivas, pois, atualmente, é possível encontrar essa planta nos cinco continentes. Essas características proporcionam a esse vegetal dar origem a uma quantidade significativa de biomassa que pode cobrir uma larga área da superfície de um corpo hídrico, causando muitos problemas ambientais e econômicos (TÉLLEZ *et al.*, 2008; PATEL; PATEL, 2015).

Essa grande quantidade de aguapé consegue esgotar o teor de nutrientes e de oxigênio da água, afetando a flora e a fauna do ecossistema aquático, além de que a alta taxa de evapotranspiração pode aumentar a crise de água do lugar onde essa planta cresce. Como o crescimento da *Eichornia crassipes* é muito intenso chegando a cobrir totalmente o leito de um rio, causa prejuízos para os setores de navegação, pesca e de energia, pois as plantas atrapalham o funcionamento das turbinas nas usinas hidrelétricas. Por causar todos esses problemas ambientais e econômicos, o aguapé é considerado uma praga aquática (TÉLLEZ *et al.*, 2008; GANGULY; CHATTERJEE; DEY, 2012; DAS *et al.*, 2016). Por esses motivos é necessário a retirada, em uma quantidade eficiente, do aguapé dos corpos hídricos. A sua biomassa pode ser utilizada para variados fins como compostagem e fertilização de solos, alimento para animais, além de fonte de energia, na forma de briquetes, ou na produção de biocombustíveis (REZANIA *et al.*, 2015). No setor de biocombustível, essa biomassa pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração (ISARANKURA-NA-AYUDHYA; TANTIMONGCOLWAT, 2007; SATYANAGALAKSHMI *et al.*, 2011; BAYRAKCI; KOÇAR, 2014; DAS *et al.*, 2015; PATEL; PATEL, 2015; DAS *et al.*, 2016).

## **2.5 Produção de Etanol 2G Utilizando Aguapé como Matéria Prima**

A produção de etanol 2G usando *Eichornia crassipes* como matéria-prima é realizada em escala laboratorial e tem o objetivo de solucionar o problema causado pelo excesso desse vegetal nos corpos hídricos (GANGULY; CHATTERJEE; DEY, 2012; BAYRAKCI; KOÇAR, 2014; DAS *et al.*, 2016).

Na etapa de pré-tratamento é utilizado um processo químico ou um processo combinado - químico com explosão a vapor. Os principais reagentes são ácido sulfúrico, para hidrólise ácida, e hidróxido de sódio, para hidrólise alcalina. Quando comparados, o processo com ácido é mais eficiente. Na fase de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica, o processo é realizado em etapas separadas, sendo a celulase o principal complexo de enzima utilizado. Na fermentação alcoólica há estudos com *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, *Clostridium thermocellum*, entretanto a *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais utilizado. Os estudos são realizados para melhorar e otimizar as metodologias desse processo, pois essa tecnologia é recente (SATYANAGALAKSHMI *et al.*, 2011; GANGULY; CHATTERJEE; DEY, 2012; BAYRAKCI; KOÇAR, 2014; PATEL; PATEL, 2015; DAS *et al.*, 2016).

Este estudo tem como finalidade pesquisar uma possível alternativa para minimizar os problemas causados pelo excesso de aguapé nos rios brasileiros. A produção de etanol 2G com esta biomassa ainda não foi estudada no país, por isso é interessante o desenvolvimento de uma metodologia eficaz para este processo biotecnológico.

### 3 OBJETIVO

Com a intenção de minimizar os problemas causados pelo excesso de *Eichornia crassipes* nos corpos hídricos brasileiros, a proposta deste trabalho é produzir etanol de segunda geração com aguapé como matéria-prima. Para isso serão pesquisados os seguintes itens:

- Rendimento dos pré-tratamentos propostos;
- Produtividade dos processos simultâneos e separados de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica;
- Metodologia mais eficaz.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e Processamento da *Eichhornia crassipes*

A *Eichhornia crassipes* (aguapé) foi coletada de forma manual no Rio Tietê, em São Manuel – SP. Os vegetais foram colhidos por meio de uma amostragem aleatória simples, em diferentes épocas do ano e na mesma área do rio, em uma distância de no máximo 2m da margem direita. As plantas de aguapé foram lavadas com água corrente, cortadas em pequenos pedaços que foram secos em estufa com circulação forçada de ar (marca Imarvil), a 60°C durante aproximadamente 50 h. Após a secagem, o aguapé seco foi moído em moinho de facas (marca Marconi), tipo Willey, com peneira de 20 mesh (0,841 mm). A biomassa em pó foi armazenada em sacos plásticos.

### 4.2 Procedimentos e Parâmetros Utilizados na Produção de Etanol 2G

Os procedimentos e os parâmetros utilizados para a realização desse trabalho foram escolhidos com base na literatura e em pré-testes realizados no laboratório. As pesquisas de Ganguly; Chatterjee; Dey (2012), Bayrakci; Koçar (2014) e Das *et al.* (2016) foram as principais estudadas, pois apresentaram resultados satisfatórios na conversão de aguapé em etanol. Com as informações da literatura foram realizados alguns testes e adaptado a metodologia para as condições laboratoriais.

Estes pré-testes foram realizados com os reagentes químicos mais utilizados na literatura, ácido sulfúrico e hidróxido de sódio. Os pré-testes foram feitos

com diferentes concentrações do ácido (1 M, 1,3 M, 1,7 M e 3 M), variações no volume da solução e da quantidade de biomassa utilizada (10 % m/v; 20 % m/v e 15 % m/v), dois valores de pressões na autoclave (2 kgf/cm<sup>2</sup> e 2,5 kgf/cm<sup>2</sup>) e diferentes intervalos de tempo (0,5 h, 1 h e 1,5 h).

Para a escolha dos reagentes químicos usados no pré-tratamento foi considerada a sustentabilidade do processo, ou seja, substâncias que causariam menores danos ao meio ambiente. Assim foram propostas metodologias de pré-tratamento químicos mais brandas que as encontradas na literatura: com ácido acético, peróxido de hidrogênio e água. Entretanto, seria necessária a utilização de um pré-tratamento com resultados conhecidos na literatura para se comparar com as metodologias propostas, sendo os processos mais usuais os que utilizam ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio. Pelos pré-testes realizados, a metodologia com ácido mostrou melhores resultados para a degradação da fibra, nas condições e equipamentos laboratoriais. A concentração das soluções foi determinada com base na atuação do ácido sulfúrico nas fibras, pois em pouca quantidade ele não consegue remover uma quantidade suficiente de lignina e de hemicelulose e, em excesso, esse ácido pode degradar grande parte da celulose. Pelos testes iniciais, a concentração que apresentou bons resultados foi a de 1,7 Molar.

Para os parâmetros utilizados na autoclave, para a hidrólise combinada com a explosão a vapor, foi considerado que as variáveis concentração, pressão e tempo estão relacionadas, de maneira que um valor alto em uma delas diminui o valor na outra. Por exemplo: para um processo ser eficiente com uma baixa concentração de reagente, é necessário uma pressão e um tempo maior no reator.

### **4.3 Pré-tratamento da Biomassa**

A metodologia utilizada para os processos de pré-tratamentos do aguapé foi desenvolvida com base nas pesquisas de Ganguly; Chatterjee; Dey, 2012, Bayrakci; Koçar, 2014, Das *et al.*, 2016, conforme ilustrada na Figura 13.

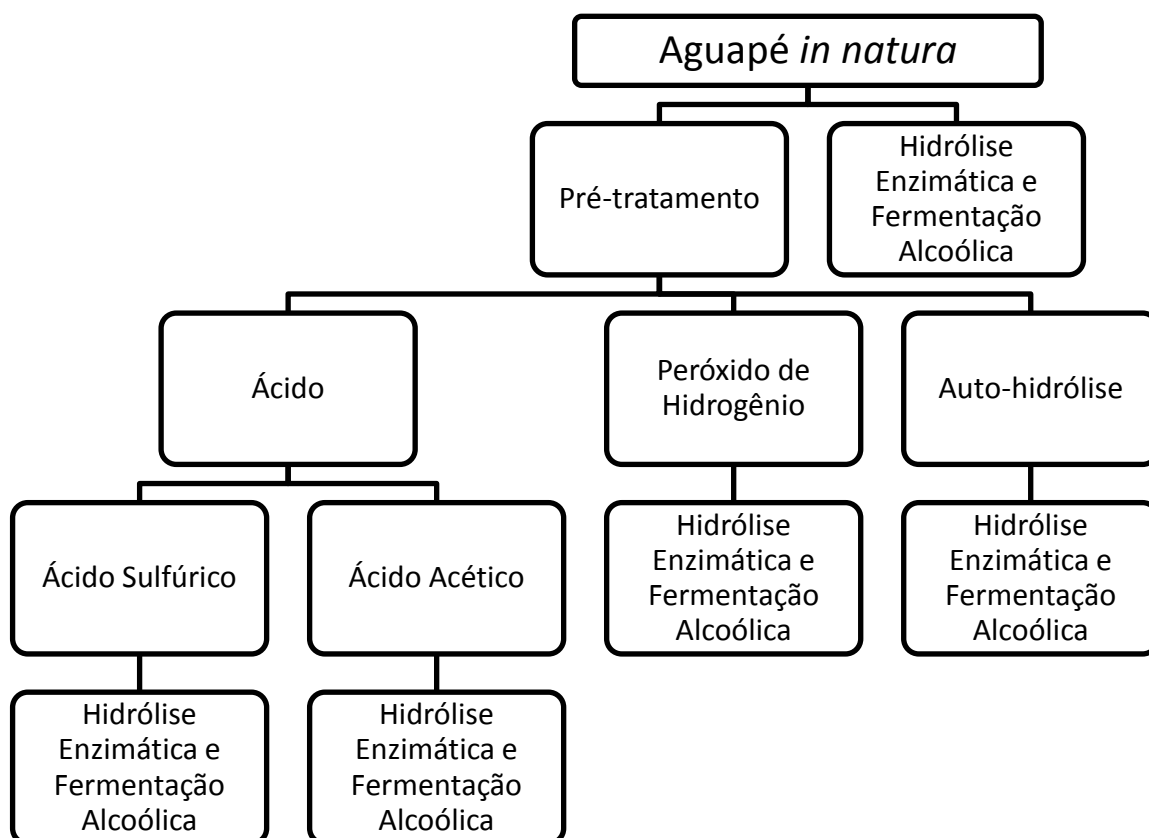


Figura 13- Esquema da metodologia utilizada nos processos de obtenção de etanol de segunda geração a partir do aguapé

O aguapé *in natura* foi submetido a quatro pré-tratamentos, com o objetivo de avaliar a eficiência do processo de remoção de hemicelulose e lignina:

- Pré-tratamento 1, utilizando ácido sulfúrico (hidrólise ácida).
- Pré-tratamento 2, utilizando ácido acético (hidrólise ácida).
- Pré-tratamento 3, utilizando peróxido de hidrogênio (hidrólise com peróxido).
- Pré-tratamento 4, utilizando água (auto-hidrólise)

As amostras de aguapé pré-tratadas foram submetidas a posterior hidrólise enzimática seguida de fermentação alcoólica. Entretanto, o aguapé *in natura*, ou seja, sem pré-tratamento, também foi submetido à hidrólise enzimática e fermentação alcoólica para avaliar o rendimento de etanol de segunda geração.

Na Tabela 2 são apresentados os parâmetros utilizados em cada pré-tratamento. Em todos os processos, a concentração dos reagentes nas soluções foi

estabelecida em 1,7 mol/L, sempre utilizando água deionizada. A quantidade de biomassa utilizada também foi estabelecida em 30 g. Todos os pré-tratamentos do aguapé foram realizados em uma autoclave vertical (marca Phoenix-Marconi, modelo: AV-75), sob pressão de 2,5 kgf/cm<sup>2</sup> por 1 hora. Após esse período, a válvula foi aberta e o vapor bruscamente liberado, em um processo denominado de explosão a vapor.

Tabela 2 – Parâmetros utilizados nos processos de pré-tratamentos.

Pré-tratamentos					
Reagentes	Concentração (M)	Biomassa (g)	Volume (L)	Pressão (kgf/cm <sup>2</sup> )	Tempo (h)
Água	-	30	2	2,5	1
Peróxido de Hidrogênio	1,7	30	2	2,5	1
Ácido Acético	1,7	30	2	2,5	1
Ácido Sulfúrico	1,7	30	2	2,5	1

Conforme ilustrado na Figura 14, após os pré-tratamentos, procederam-se lavagens de forma a remover os reagentes e componentes da parede vegetal. Inicialmente, as amostras foram filtradas (peneira de 200 mesh) e lavadas com água deionizada. Em seguida, as mesmas foram novamente filtradas e imersas em uma solução de acetona 20% durante 15 minutos. Após este período, as amostras foram lavadas com água deionizada e submetidas à sonicação em pequenas quantidades (40 mL em cada ciclo), utilizando-se o disruptor de células ultrassônico (marca Unique) por 9 minutos. Finalmente, procedeu-se a secagem das amostras em estufa a 50°C. O aguapé pré-tratado e seco foi armazenado em sacos plásticos.

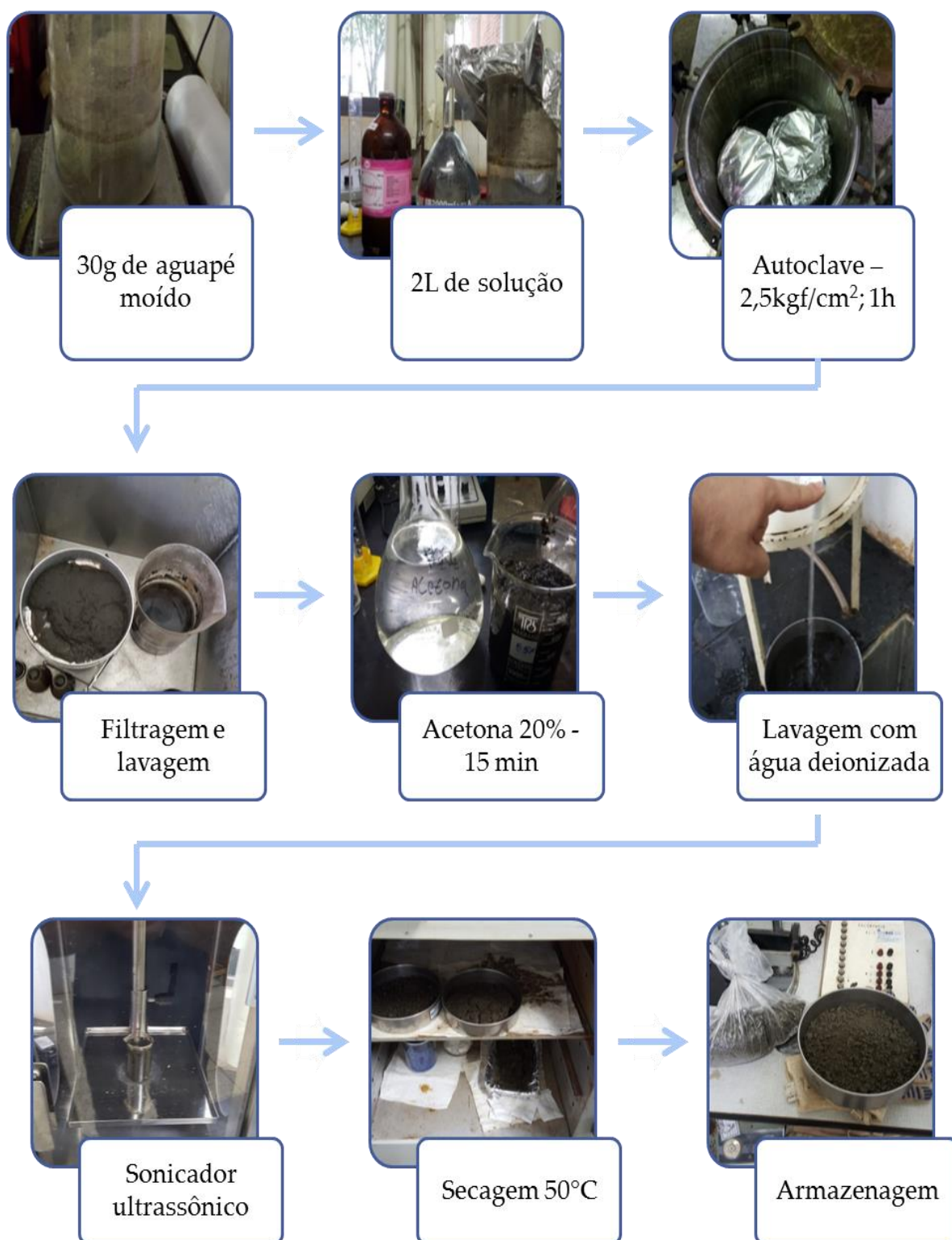


Figura 14 – Esquema geral do processo de pré-tratamento da biomassa de aguapé. Todos os pré-tratamentos - auto-hidrólise, hidrólise com peróxido e hidrólise ácida - seguiram o mesmo procedimento.



## 4.4 Caracterização e Análises

### 4.4.1 Umidade do Aguapé *In Natura*

O teor de umidade do aguapé *in natura* foi determinado pelo método TAPPI 264 cm-97. Em uma balança com precisão de 0,0001 g, foi pesada a biomassa úmida ( $m_u$ ) em um cadinho previamente tarado. Após 4 h em estufa a 105°C, o cadinho foi colocado em um dessecador até resfriar e pesado novamente ( $m_s$ ). O teste foi realizado em triplicata e o cálculo do teor de umidade foi calculado conforme a Equação (1).

$$Umidade (\%) = \left( \frac{m_u - m_s}{m_u} \right) * 100 \quad \text{Equação (1)}$$

### 4.4.2 Metais Pesados

Para determinação dos índices de metais pesados no aguapé sem pré-tratamento foi utilizado um espectrofotômetro de emissão óptica com plasma induzidos. A análise foi realizada no Laboratório de Metais Pesados, no Departamento de Solos e Recursos Ambientais na Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA) – UNESP.

### 4.4.3 Caracterização Química

Os teores de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas da biomassa sem pré-tratamento e amostras de aguapé pré-tratadas foram qualificados baseando-se nas normas TAPPI (*Technical Association of the Pulp and Paper Industry*). Previamente às análises, determinaram-se os teores de umidade das amostras, utilizando-se uma balança de umidade (marca: Shimadzu, modelo: MOC63U).

- **Teor de Extrativos**

O teor de extrativos totais foi determinado pelo método da norma TAPPI 204 om-88. Foi pesado em cartuchos extratores (saquinhos de papel de filtro) o equivalente a 2 g (peso seco). Extraíu-se em Soxhlet com álcool-tolueno (1:2) durante 8 h. Substituiu-se a mistura de álcool-tolueno por álcool 96° e extraíu-se novamente durante 8h.

Os saquinhos foram removidos do Soxhlet e extraiu-se com água quente durante 3 h. As amostras secaram ao ar dentro do saquinho por uma semana. As amostras foram retiradas dos saquinhos e pesadas em béqueres previamente tarados. Os cálculos foram realizados conforme a Equação (2).

$$\text{Extrativo (\%)} = \left( \frac{\text{massa de extrativo}}{2} \right) * 100 \quad \text{Equação (2)}$$

$$\text{massa de extrativo} = (\text{massa aguapé antes da extração}) - (\text{massa aguapé depois da extração})$$

- **Teor de Cinzas**

A análise de teor de cinzas seguiu a norma TAPPI T211 om-02. Colocou-se o cadinho de porcelana na mufla em temperatura de 575°C por 1 hora. Retirou-se o cadinho e, após esfriar em dessecador com sílica, ele foi pesado em balança analítica. No cadinho foi pesado 2 g de biomassa (massa total 1) e deixou-se em estufa de um dia para o outro à temperatura de 105 °C, para a determinação da massa seca. Após esse tempo, retirou-se o cadinho da estufa e o deixou esfriar em dessecador e pesou-se (massa total 2). Os cadinhos retornaram para a mufla a 575°C por no mínimo 4 h. O teste foi realizado em duplicata e o teor de cinzas foi determinado pela Equação (7).

$$\text{Cinzas (\%)} = \left( \frac{\text{massa cinzas}}{\text{massa seca}} \right) * 100 \quad \text{Equação (3)}$$

$$\text{massa seca} = \text{massa total (1)} - \text{tara do cadinho}$$

$$\text{massa cinzas} = \text{massa total (2)} - \text{tara do cadinho}$$

- **Teor de Lignina**

A norma referente a determinação de lignina é a TAPPI 222 om-83. As amostras de 1g (peso seco) foram colocadas em saquinhos de papel filtro e os extrativos foram extraídos seguindo a metodologia descrita no item “teor de extrativos”. As amostras foram transferidas para um béquer e adicionado 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%, à temperatura de 18-20°C, por 2h, homogeneizando periodicamente. Após esse processo, a amostra foi transferida para erlenmeyer de 1L usando 560mL de água deionizada. A solução foi mantida em ebulição por 4h, mantendo-se o volume constante. Após deixar a lignina

sedimentar totalmente, filtrou-se através de cadinho de vidro sintetizado (nº 2) com auxílio de uma bomba a vácuo. O cadinho foi seco em estufa e pesado. A análise foi realizada em duplicata e o teor foi determinado pela Equação (4).

$$\text{Resíduo (\%)} = \left( \frac{\text{massa resíduo}}{1} \right) * 100 \quad \text{Equação (4)}$$

$$\text{massa resíduo} = \text{massa total} - \text{tara do cadinho}$$

O resíduo permanente no cadinho de vidro sintetizado foi transferido para um cadinho de porcelana, previamente tarado. Esse foi colocado na mufla em temperatura de 575°C por 1 hora. Este procedimento foi realizado para o cálculo do teor de cinzas presente na lignina, que foi calculado conforme a Equação (3). O valor real do teor de lignina foi determinado pela Equação (5).

$$\text{Lignina (\%)} = \text{Resíduo (\%)} - \text{Teor de cinzas na lignina (\%)} \quad \text{Equação (5)}$$

- **Teor de Holocelulose**

A determinação da holocelulose foi realizada empregando-se a norma TAPPI T257 om-85. Para esta análise foi pesado 2g da amostra (peso seco). Após a extração dos extrativos, a amostra foi transferida para erlenmeyer e foi adicionada 55 mL de água deionizada, 3 mL de solução de clorito de sódio 20 % e 2 mL de ácido acético (1:5). A amostra foi colocada em banho termostático a 70 °C e a cada 45 minutos adicionaram-se mais 3 mL de NaClO<sub>2</sub> e 2 mL de ácido acético, totalizando cinco adições. Após o último tratamento, filtrou-se através de cadinho de vidro sintetizado (nº 2) tarado e lavou-se com 250 mL de água deionizada. O material retido no filtro foi seco em estufa e pesado. O teste foi realizado em duplicata e calculou-se a porcentagem de resíduo através da Equação (6):

$$\text{Resíduo (\%)} = \left( \frac{\text{massa resíduo}}{2} \right) * 100 \quad \text{Equação (6)}$$

$$\text{massa resíduo} = \text{massa total} - \text{tara do cadinho}$$

Para o cálculo do teor de cinzas na holocelulose foi utilizado o mesmo procedimento para o teor de cinzas na lignina. O resíduo permanente no cadinho de vidro sintetizado foi transferido para um cadinho de porcelana, previamente tarado. Esse foi colocado na mufla em temperatura de 575°C por 1 hora. O valor real do teor de holocelulose foi determinado pela Equação (7).

$$\text{Holocelulose (\%)} = \text{Resíduo (\%)} - \text{Teor de cinzas na holocelulose (\%)} \quad \text{Equação (7)}$$

- **Teor de Celulose**

A análise para a determinação do teor de celulose seguiu a metodologia da TAPPI 203 cm-99. Foi pesado, em um almofariz, 1g da holocelulose seca obtida no item “teor de holocelulose”. Foi adicionado 15mL de uma solução de NaOH 17,5%, aguardou-se 2 minutos de contato entre a solução e a celulose antes de começar a triturar o material por 8 minutos. Após a trituração foi adicionado 40mL de água deionizada e o conteúdo foi transferido quantitativamente para o funil, onde foi filtrado com ajuda de uma bomba á vácuo. O precipitado no funil foi seco em estufa e pesado em balança analítica. Para o cálculo do teor de resíduo celulose usou-se a Equação (8).

$$\text{Resíduo (\%)} = \left( \frac{\text{massa resíduo}}{\text{massa holocelulose}} \right) * 100 \quad \text{Equação (8)}$$

$$\text{massa resíduo} = \text{massa total} - \text{tara do cadinho}$$

$$\text{massa hemicelulose} = \text{massa da amostra de holocelulose}$$

O resíduo permanente no cadinho de vidro sintetizado foi transferido para um cadinho de porcelana, previamente tarado. Esse foi colocado na mufla em temperatura de 575°C por 1 hora. Este procedimento foi realizado para o cálculo do teor de cinzas presente na celulose, que foi calculado conforme a Equação (3). O valor real do teor de celulose foi determinado pela Equação (9).

$$\text{Lignina (\%)} = \text{Resíduo (\%)} - \text{Teor de cinzas na lignina (\%)} \quad \text{Equação (9)}$$

- **Teor de Hemicelulose**

O teor de hemicelulose foi calculado com base nos resultados do teor de holocelulose e de celulose, conforme a Equação (10).

$$\text{Hemicelulose (\%)} = (\text{massa holocelulose} - \text{massa celulose}) * 100 \quad \text{Equação (10)}$$

#### 4.4.4 Análises Termogravimétricas (TG-DTA)

As análises de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) foram utilizadas para observar e comparar a estabilidade térmica do aguapé *in natura* e dos diferentes pré-tratamentos e a temperatura de degradação da biomassa. A alteração da massa foi medida em relação à temperatura e ao tempo. O equipamento utilizado nesse processo foi o SDT 2960, a amostra com 7mg foi colocada em um cadinho de óxido de alumínio e aquecida progressivamente a 10°C/min com um fluxo de ar de 100mL/min.

#### 4.4.5 Difração de Raio-X (XRD)

A análise de difração de raios-X (DRX) permite determinar o grau de cristalinidade do material lignocelulósico e a eficiência dos tratamentos na remoção da lignina por meio da análise do perfil do difratograma. Os índices de cristalinidade (IC) do aguapé *in natura* e pré-tratados foram calculados conforme a equação de Buschle-Diller-Zeronian (Equação 11) que permite calcular o grau de cristalinidade das amostras.

$$IC = \left(1 - \frac{I_1}{I_2}\right) * 100 \quad \text{Equação (11)}$$

Onde:  $I_1$  é a mínima intensidade referente ao material amorfo e  $I_2$  é a máxima intensidade referente ao pico de cristalinidade de gráfico

As análises foram realizadas em um difratômetro Rigaku Ultima IV, com o raio-X sendo gerado em um tubo de cobre (CuK $\alpha$ 1) com uma voltagem de 40kV e uma corrente de 30mA, e com o comprimento de onda de  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ .

#### **4.4.6. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Para a determinação dos grupos funcionais nas amostras, e as alterações das ligações dos grupos carboxílicos na biomassa pré-tratada foi utilizada a análise da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Nessa análise foi utilizada o equipamento FTIR Nicolet IS10, e as amostras foram detectadas na região de 4000 a 400 $\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.5 Hidrólise Enzimática e Fermentação Alcoólica**

Duas metodologias foram utilizadas para o processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica: simultânea e separada. Em ambos os processos, utilizou-se erlenmeyers de 250 mL de capacidade como biorreatores, onde foi pesado 5g de biomassa (peso seco) e 200mL de água deionizada. O pH das soluções foi acertado (pHmetro Lucadema, modelo: mPA210), com ácido cítrico (que não tem ação inibitório na fermentação como o ácido acético) ou hidróxido de sódio, ambos preparados na concentração de 1 molar. A esterilização deu-se por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos. Em seguida, a hidrólise enzimática e a fermentação alcoólica foram realizadas em uma incubação de agitação orbital.

Na primeira metodologia, os processos de hidrólise e fermentação foram realizados no mesmo biorreator e ao mesmo tempo, no segundo foram utilizados dois biorreatores e os processos aconteceram em sequência.

O experimento foi realizado em duplicata, constituído de cinco amostras de biomassa (pré-tratamentos com ácido sulfúrico, ácido acético, peróxido de hidrogênio, auto-hidrólise, e aguapé sem pré-tratamento) e dois processos de hidrólise e fermentação (hidrólise enzimática e fermentação alcoólica simultânea e separada). A Figura 15 é um esquema da preparação dos biorreatores.

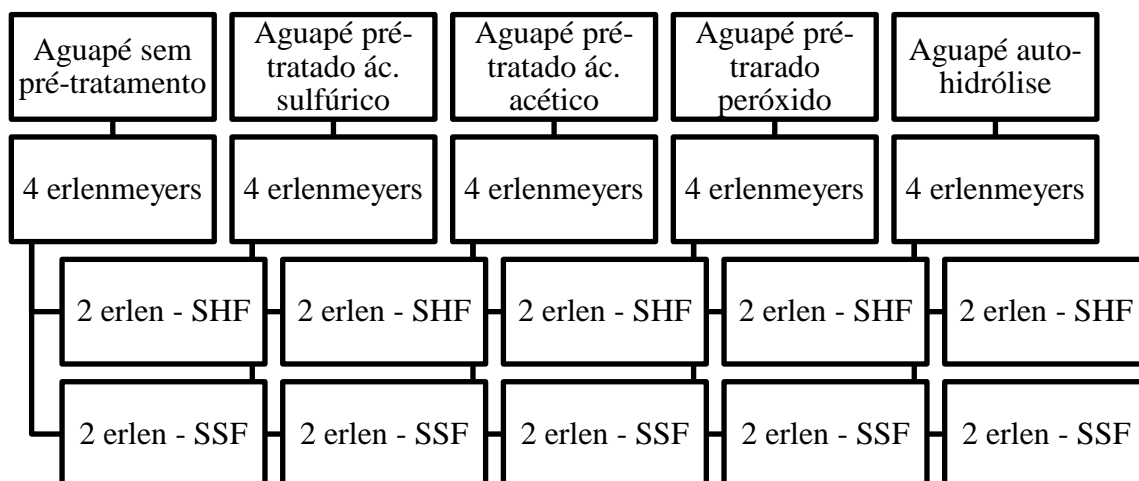


Figura 15 - Esquema de preparação dos biorreatores para os processos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica. SHF – Hidrólise enzimática e fermentação alcoólica separadas; SSF – Hidrólise enzimática e fermentação alcoólica simultâneas.

#### 4.5.1 Hidrólise e Fermentação Simultâneas (SSF)

Nos processos de hidrólise enzimática foi utilizado uma enzima comercial da Novozymes, empresa dinamarquesa, a CellicCTec3.

Nos processos de fermentação alcoólica foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, da marca *Fleischmann*, com o nome comercial de Fermento Biológico Seco e Instantâneo. A levedura foi inoculada em uma solução com 5brix por 24h.

Nesse processo o pH dos biorreatores foram estabilizados em 4,8. Após serem autoclavados e resfriados foi colocado 1,5 mL de celulase em cada biorreator e 20 mL da solução contendo a levedura. Os 10 biorreatores foram incubados sob agitação orbital, 120 rpm a 38°C por 70 horas.

Após o final do processo, os erlenmeyers foram colocados no banho-maria (marca: EthikTechnology, modelo: 500-1D) a 90°C, para inativar as enzimas e matar as leveduras, por aproximadamente 15 min. Por fim, as soluções (hidrolisadas e fermentadas) foram filtradas com auxílio de uma bomba a vácuo (marca: Biothec) e o sólido (biomassa restante) e o líquido foram armazenados em freezer -20°C para posteriores análises. Na Figura 16 é apresentado um fluxograma deste processo.

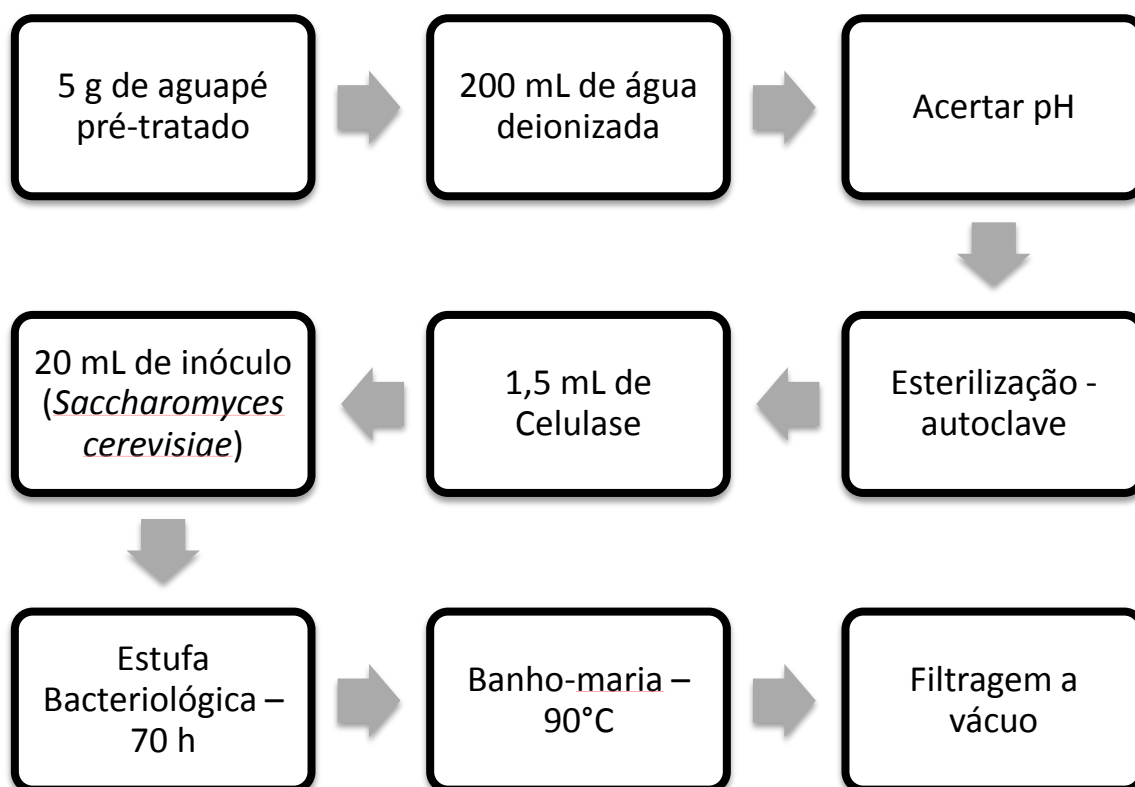


Figura 16 - Fluxograma do processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica simultâneas (SSF)

#### 4.5.2 Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF)

O preparo dos frascos foi idêntico ao item 4.5.1 “Hidrólise e Fermentação Simultâneas (SSF)”. Contudo, neste experimento, o pH das soluções foram estabilizados para 5,0 antes da esterilização por autoclavagem. Após a esterilização os biorreatores resfriaram e, foi adicionado 1,5 mL da enzima comercial celulase CellicCTec3, seguido de incubação sob agitação orbital (120 rpm), a 50°C durante 70 h. Após, os frascos foram colocados no banho-maria a 90°C por 15min, para a inativação da enzima. Após resfriamento o pH das soluções hidrolisadas, foi estabilizado em 4,8.

Foram novamente autoclavados antes de ser adicionado 20 mL de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*. Os biorreatores foram novamente incubados sob agitação orbital (120 rpm) em 32°C por 70 h.

Ao final do processo os mesmos foram colocados no banho-maria para matar as leveduras. As soluções foram filtradas com auxílio de uma bomba a vácuo e o líquido e o sólido foram armazenados, em *freezer* a -20°C, para posterior análise. A Figura 17 é um fluxograma deste processo.



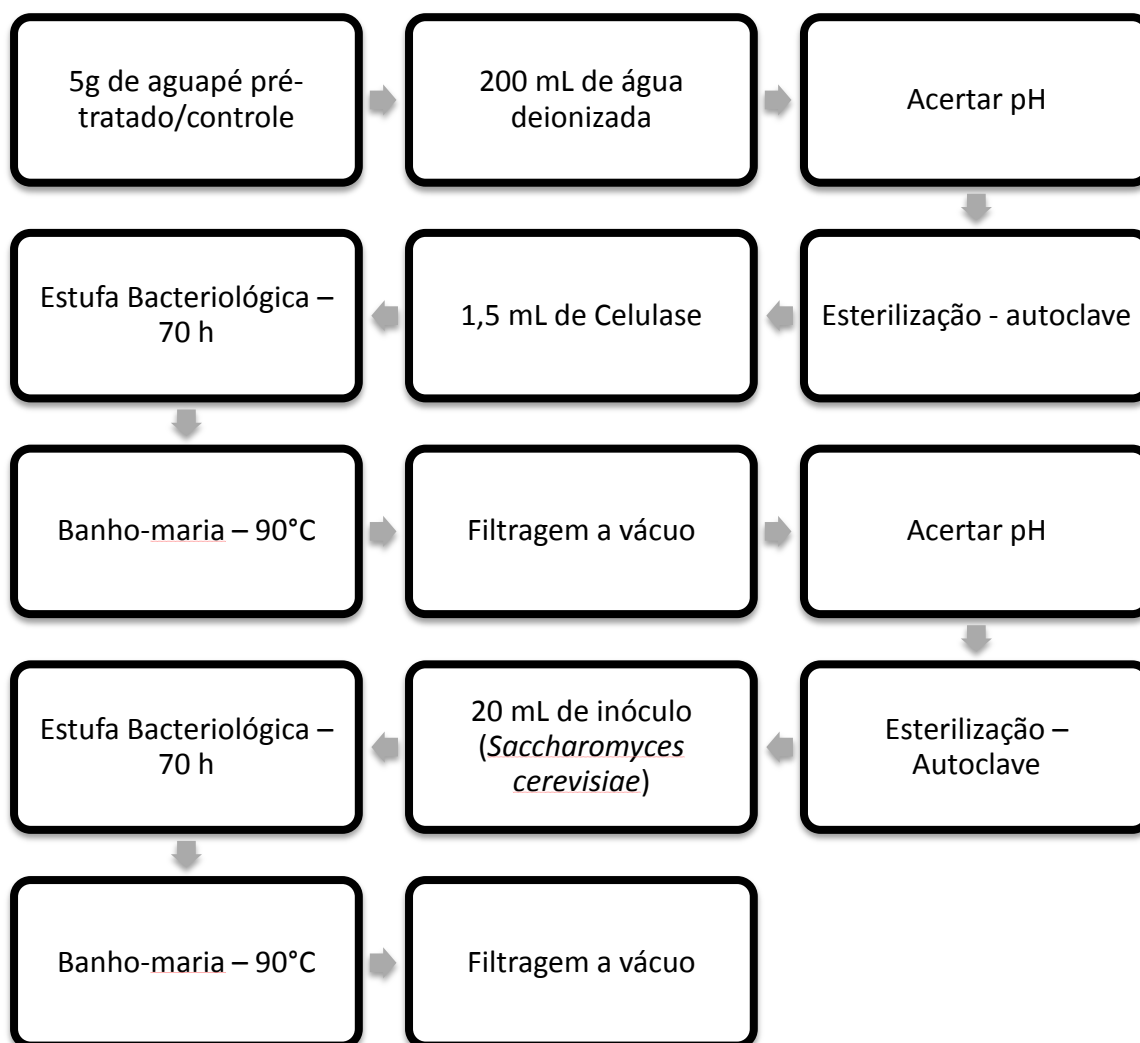


Figura 17 - Fluxograma do processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica separadas (SHF).

#### 4.6 Destilação

Os líquidos filtrados dos processos SSF e SHF foram destilados em um destilador (marca: BUCHI, modelo: Unit K-355), no laboratório de Bebidas da UNESP/FCA, utilizando-se 100 mL da fração líquida e sendo recolhidos 100 mL em balão volumétrico do destilado. Essa solução de etanol e água foi analisada em um densímetro (marca: METTLER, modelo: DA-310). Os resultados foram convertidos conforme a tabela densidade/teor alcoólico (°GL) de acordo com as recomendações do fabricante do equipamento.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização Química

#### 5.1.1 Umidade do Aguapé *In Natura*

Esta análise é realizada para calcular a quantidade de matéria seca presente no aguapé natural, sem nenhum tratamento físico. Na Tabela 3 é apresentado o valor de matéria seca e da umidade do aguapé *in natura*.

Tabela 3 – Quantidade de matéria seca e umidade no aguapé natural e análise estatística dos resultados

Aguapé	Média (%)	Desvio padrão	Erro padrão	Coef. variação	Coef. confiança	Limite inferior	Limite superior
Matéria seca	2,4655	0,1828	0,0746	0,0303	0,1463	2,4611	2,4960
Umidade	97,5345	0,1828	0,0746	0,0008	0,1463	97,5300	97,5649

Na literatura, o valor relatado para a umidade do aguapé *in natura* é no intervalo de 93-96 %, sendo o mais usual o valor de 95 % (ROMITELLI, 1983; REZANIA *et. al.*, 2015). Portanto, o valor encontrado de 97,5 % de umidade é similar aos observados na literatura.

Esse resultado mostra que a *Eichhornia crassipes* tem pouca quantidade de matéria seca, apenas 2,5 %. Ou seja, em 1kg de aguapé há apenas 25 g de matéria seca e esta fração é composta por matéria orgânica (celulose, hemicelulose, lignina, entre outros) e matéria inorgânica (cinzas).

Em todos os procedimentos de análises e de pré-tratamentos foram utilizados aguapé moído seco, ou seja, apenas a fração da matéria seca.

### 5.1.2 Metais Pesados

Uma das principais características do aguapé é conseguir retirar substâncias, como metais pesados, do meio aquático em que ele cresce. Por isso, é esperada uma quantidade de metais pesados na biomassa seca da *Eichhornia crassipes* e suas concentrações dependem da poluição dos corpos hídricos. Na Tabela 4 são apresentados os valores encontrados na biomassa de aguapé utilizada neste trabalho e valores encontrados na literatura.

Tabela 4 – Concentrações de metais pesados na biomassa de aguapé seco

Estudos / Metais pesados	mg do elemento/kg de massa seca do aguapé								
	Ar	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Resultados encontrados neste trabalho <sup>1</sup>	4,31	-	5,5	-	-	-	-	4,1	-
GONÇALVES JR, <i>et. al</i> , 2009 <sup>2</sup>	-	-	10	30	-	-	1	-	51
SINGH; KALAMDHAD, 2013 <sup>3</sup>	-	43	301	40	13	645	180	1140	152

Aguapé foi coletado: 1 - Rio Tietê – São Manuel (SP); 2 – Lago Internacional de Itaipu – Mal Candido Rondon (Pr); 3 - Na área industrial de Amingoan – Índia.

### 5.1.3 Eficiência dos pré-tratamentos

No processo de pré-tratamento um dos critérios é retirar ou solubilizar os compostos que podem prejudicar a etapa de hidrólise enzimática, ou seja, extrativos, lignina e hemicelulose. Por esse motivo, neste trabalho, a eficiência foi calculada com base no que foi eliminado do material, ou seja, o pré-tratamento que obteve a maior perda de massa foi considerado o mais eficiente.

Conforme a Tabela 5, o pré-tratamento mais eficiente é o com ácido sulfúrico, seguido pelo com peróxido de hidrogênio, ácido acético e por último a auto-hidrólise. Entretanto, esses dados não mostram quais componentes foram solubilizados, se apenas a lignina e a hemicelulose ou se uma quantidade de celulose foi eliminada.

Tabela 5 – Perdas de massas referentes aos processos de pré-tratamento

Pré-tratamento	Massa aguapé (g)	Massa aguapé pré-tratado (g)	Perda de massa (g)	Perda de massa (%)	Rendimento (%)
Água	27,2425	17,2204	10,0221	37%	63%
Peróxido de hidrogênio	27,2425	14,1240	13,1185	48%	52%
Ácido acético	27,5140	15,5477	11,9663	43%	57%
Ácido sulfúrico	27,9666	8,1276	19,8390	71%	29%

#### 5.1.4 Componentes da *Eichhornia crassipes*

Neste estudo, para o aguapé *in natura* seco, foram encontrados os seguintes valores para os componentes vegetais: 26 % de celulose, 27 % de hemicelulose, 9 % de lignina, 22 % de cinzas e 19 % de extrativo. Esses valores são similares às médias descritas para estes componentes na literatura: 25 % de celulose, 35 % de hemicelulose, 10% de lignina e 2 5% de cinzas (GANGULY; CHATTERJEE; DEY, 2012; REZANIA *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2016). O teor de cinzas é alto, em comparação com outros vegetais, por causa da propriedade desta planta retirar substâncias inorgânicas dos corpos hídricos, como os metais pesados.

Os teores dos componentes da biomassa pré-tratada foram calculados com base na perda de massa de cada pré-tratamento, conforme apresentado na Tabela 5, no item 5.1.3 “Eficiência dos pré-tratamentos”.

Os resultados dos cálculos para os componentes do aguapé sem pré-tratamento e pré-tratados estão apresentados nas tabelas seguintes, sendo a Tabela 6 referente ao teor de celulose, a Tabela 7 ao de hemicelulose, a Tabela 8 ao teor de lignina, a Tabela 9 apresenta o teor de cinzas e a Tabela 10 o teor de extrativos.

Tabela 6 – Teor de celulose e análise estatística dos resultados.

	Pré-tratamentos				
	Sem pré-tratamento	Ácido sulfúrico	Ácido acético	Peróxido de hidrogênio	Água
Teor de celulose (%)	26,0157	11,3321	14,9237	12,1854	17,9605
Desvio padrão	1,8549	0,0330	0,4812	1,8767	1,2862
Erro padrão	1,3116	0,0233	0,3403	1,3270	0,9095
Coef. variação	0,0504	0,0021	0,0228	0,1089	0,0506
Coef. confiança	2,5707	0,0457	0,6669	2,6009	1,7825
Limite inferior	23,6314	11,3313	14,7633	9,7448	16,8142
Limite superior	28,3999	11,3328	15,0842	14,6260	19,1068

Tabela 7 – Teor de hemicelulose e análise estatística dos resultados.

	Pré-tratamentos				
	Sem pré-tratamento	Ácido sulfúrico	Ácido acético	Peróxido de hidrogênio	Água
Teor de hemicelulose (%)	27,4272	8,5130	22,1236	22,3209	26,9738
Desvio padrão	1,6942	0,4016	1,9100	4,4005	4,3977
Erro padrão	1,1980	0,2008	0,9550	2,2003	2,1988
Coef. variação	0,0437	0,0236	0,0432	0,0986	0,0815
Coef. confiança	2,3480	0,3935	1,8718	4,3124	4,3097
Limite inferior	25,4383	8,4735	21,2299	17,5766	22,2357
Limite superior	29,0512	8,5525	23,0174	27,0651	31,7120

Tabela 8– Teor de lignina e análise estatística dos resultados.

	Pré-tratamentos				
	Sem pré-tratamento	Ácido sulfúrico	Ácido acético	Peróxido de hidrogênio	Água
Teor de lignina (%)	8,7522	4,5700	8,9584	7,3690	8,1977
Desvio padrão	1,1926	0,2815	0,4125	1,6170	1,6480
Erro padrão	0,5963	0,1990	0,2063	0,8085	0,8240
Coef. variação	0,0681	0,0436	0,0230	0,1097	0,1005
Coef. confiança	1,1688	0,3901	0,4043	1,5847	1,6150
Limite inferior	8,4037	4,5151	8,9167	6,7284	7,5323
Limite superior	9,1007	4,6088	9,0001	8,0096	8,8631

Tabela 9 – Teor de cinzas e análise estatística dos resultados.

	Pré-tratamentos				
	Sem pré-tratamento	Ácido sulfúrico	Ácido acético	Peróxido de hidrogênio	Água
Teor de cinzas (%)	22,3962	4,0689	7,0954	5,8923	9,0847
Desvio padrão	2,1590	0,8143	0,4196	0,4151	1,1996
Erro padrão	1,5266	0,4071	0,2098	0,2075	0,5998
Coef. variação	0,0682	0,1001	0,0296	0,0352	0,0660
Coef. confiança	2,9922	0,7980	0,4112	0,4068	1,1755
Limite inferior	19,1661	3,9064	7,0522	5,8501	8,7322
Limite superior	25,6263	4,2313	7,1385	5,9345	9,4372

Tabela 10 – Teor de extrativos e análise estatística dos resultados.

	Pré-tratamentos				
	Sem pré-tratamento	Ácido sulfúrico	Ácido acético	Peróxido de hidrogênio	Água
Teor de extrativos (%)	19,4921	3,8644	3,9386	3,9264	3,8366
Desvio padrão	1,6333	0,7646	1,2212	0,3882	1,4694
Erro padrão	1,1549	0,3823	0,6106	0,2241	0,7347
Coef. variação	0,0592	0,0989	0,1550	0,0571	0,1915
Coef. confiança	2,2635	0,7493	1,1968	0,4393	1,4400
Limite inferior	17,6437	3,7212	3,5732	3,8696	3,3076
Limite superior	21,3406	4,0077	4,3040	3,9833	4,3656

Comparando os valores dos componentes celulares (celulose, hemicelulose, lignina, extrativo e cinzas) do aguapé *in natura* com as biomassas pré-tratadas, é possível observar que em todos os itens houve redução dos teores, conforme apresentado na Tabela 11, que sintetiza os resultados das tabelas anteriores: Tabela 5, Tabela 6, Tabela 7, Tabela 8, Tabela 9 e Tabela 10.

Tabela 11 – Comparação dos componentes vegetais da biomassa sem pré-tratamento e das biomassas pré-tratadas.

	Componentes vegetais					
	Perda de Massa (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Extrativo (%)	Cinzas (%)
Sem Pré-Tratamento	-	26	27	9	19	22
Ácido Sulfúrico	71	11	9	5	4	4
Ácido Acético	43	15	22	9	4	7
Peróxido de Hidrogênio	48	12	22	7	4	6
Água	37	18	27	8	4	9

Por esses dados, o pré-tratamento mais eficiente é o com ácido sulfúrico, pois conseguiu eliminar uma maior quantidade de lignina e hemicelulose. Entretanto, esse procedimento também eliminou uma porcentagem de celulose, o que é prejudicial à produção de etanol de segunda geração. Na auto-hidrólise a porcentagem de celulose perdida foi menor em comparação com os outros pré-tratamento, entretanto comparando com o aguapé sem tratamento não houve redução no teor de hemicelulose e apenas 1% de redução da lignina.

### 5.1.5 Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial (TG-DTA)

Pela curva de TG-DTA é possível estudar o comportamento da degradação térmica da biomassa de aguapé e é possível determinar se um pré-tratamento altera as características da mesma.

Na Figura 18 é possível observar uma similaridade nas perdas de massas de todas as amostras. Portanto, pode-se observar que a biomassa do aguapé tem quatro etapas de perda de massa. A primeira fase de decomposição térmica do aguapé acontece no intervalo de 25°C a 200°C, referente à desidratação da amostra. Na segunda etapa, o intervalo de temperatura varia entre 200°C e 500°C, onde são observados dois picos exotérmicos, sendo associado à perda de hemicelulose e celulose. Na terceira etapa, entre 500°C e 650°C, o pico exotérmico é referente à decomposição de lignina. A quarta

etapa de decomposição, em temperaturas superiores a 650°C referem-se à queima do material restante.

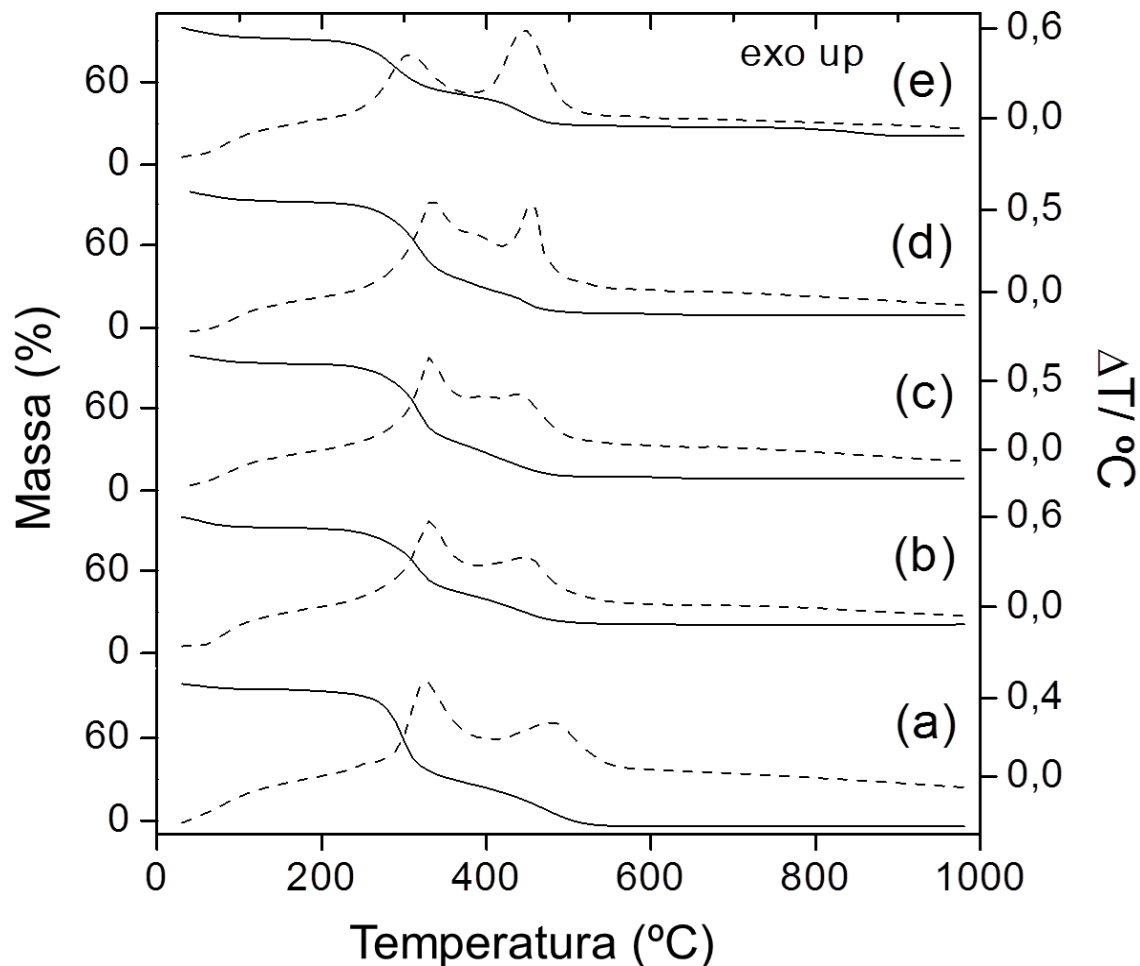


Figura 18- Curvas de TG-DTA do aguapé pré-tratado com (a) ácido sulfúrico; (b) ácido acético; (c) peróxido de hidrogênio; (d) água e (e) aguapé sem pré-tratamento. A linha contínua é referente a curva de TG – massa da amostra registrada em função da temperatura [ $m = f(T)$ ] e a linha pontilhada referente a curva de DTA - diferença entre a temperatura da amostra e da referência ( $T_r - T_a = \Delta T$ ) em função da temperatura, com um aquecimento em ritmo linear ( $dT/dt = Cte$ ) [ $\Delta T = f(T)$ ], os picos são proporcionais ao calor de reação por unidade de massa das substâncias ativas na amostra (IONASHIRO, 2004).

A Tabela 12 e a Figura 19 apresentam os resultados obtidos com as curvas de TG-DTA, mostrando a quantidade, em porcentagem, de perda de massa de cada pré-tratamento referente a cada uma das quatro etapas. Os resultados estão coerentes com os encontrados na literatura. Bergier *et al.*, (2015) e Gao *et al.* (2016), relataram que a maior perda de massa foi na segunda etapa, referente à celulose e a hemicelulose, em uma



temperatura aproximada de 400°C e que a lignina, por ser mais estável, se degradou em uma temperatura superior.

Tabela 12 – Resultados da análise de TG-DTA do aguapé pré-tratado com (a) ácido sulfúrico; (b) ácido acético; (c) peróxido de hidrogênio; (d) água e (e) aguapé sem pré-tratamento

Aguapé/Etapas		H <sub>2</sub> O (1°)	2°	3°	4°	Resíduo
		Perda de água	Perda de celulose e hemicelulose	Perda de lignina	Perda material restante	
<b>Ácido Sulfúrico</b>	Massa (%)	4,70	64,73	30,64	0	0
	Temperatura (°C)	(149,07)	(373,8)	(575,09)	-	(807,00)
<b>Ácido Acético</b>	Massa (%)	9,01	48,72	20,76	1,12	20,58
	Temperatura (°C)	(164,39)	(379,96)	(538,3)	(668,06)	(950)
<b>Peróxido de Hidrogênio</b>	Massa (%)	8,15	59,12	22,38	1,73	8,71
	Temperatura (°C)	(187,89)	(373,83)	(510,73)	(682,86)	(950)
<b>Água</b>	Massa (%)	8,82	56,70	23,39	1,98	9,05
	Temperatura (°C)	(190,96)	(370,76°C)	(509,71)	(674,2)	(902,01)
<b>Aguapé sem pré-tratamento</b>	Massa (%)	8,91	40,58	21,88	1,16	6,32
	Temperatura (°C)	(176,65)	(372,8)	(530,14)	(649,6)	(919,38)

A Tabela 12 e a Figura 19 mostram que, na primeira etapa, onde ocorre a desidratação da amostra, o pré-tratamento com ácido acético teve a maior perda de massa, 9,01%. Entre as fases é possível observar que a 2ª é onde o aguapé perde mais massa, seguido pela fase 3. O aguapé pré-tratado com ácido sulfúrico foi o que mais perdeu massa nas fases 2 e 3, não sendo quantificado material nas etapas seguintes, o que mostra que o pré-tratamento foi eficiente na eliminação de extrativos e resíduos. A maior quantidade de resíduos foi encontrado no aguapé sem pré-tratamento. Com esses dados é possível afirmar que os processos de pré-tratamento alteram significativamente as características da biomassa do aguapé.

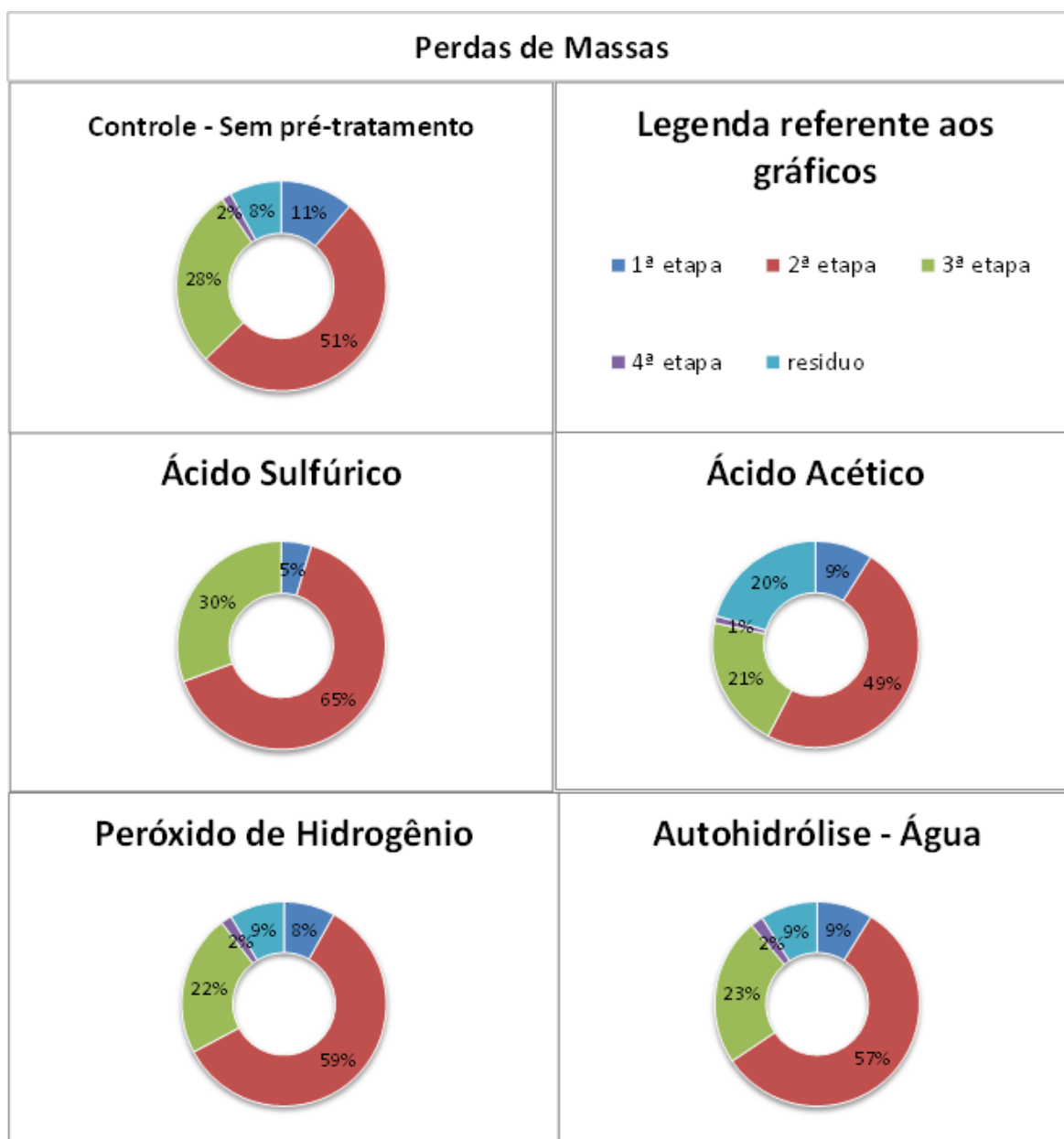


Figura 19 – Comparação entre as perdas de massas apresentadas na análise de TG-DTA do aguapé pré-tratado.

### 5.1.6 Análise de Difração de Raio-X (XRD)

Essa análise foi utilizada para estudar as alterações na estrutura cristalina do aguapé nos diferentes pré-tratamentos. Os picos do gráfico de difração de Raio-X indicam a cristalinidade da matéria. A lignina tem característica amorfa, enquanto a celulose é majoritariamente cristalina, conforme (TASKER *et al.*, 1994) a celulose de tipo I é caracterizada pelos picos  $2\theta = 23^\circ$ ,  $21^\circ$ ,  $17^\circ$  e  $15^\circ$ . Portanto, pode-se assumir que

um aumento na área cristalina no gráfico de XRD significa remoção da lignina e/ou da parte amorfa da celulose, em ambos os casos aumentando a acessibilidade à celulose cristalina (TASKER *et al.*, 1994; SATYANAGALAKSHMI *et al.*, 2011). A Figura 20 apresenta os gráficos da análise de difração de raio-X do aguapé pré-tratado com (a) ácido sulfúrico; (b) ácido acético; (c) peróxido de hidrogênio; (d) água e (e) aguapé sem pré-tratamento.

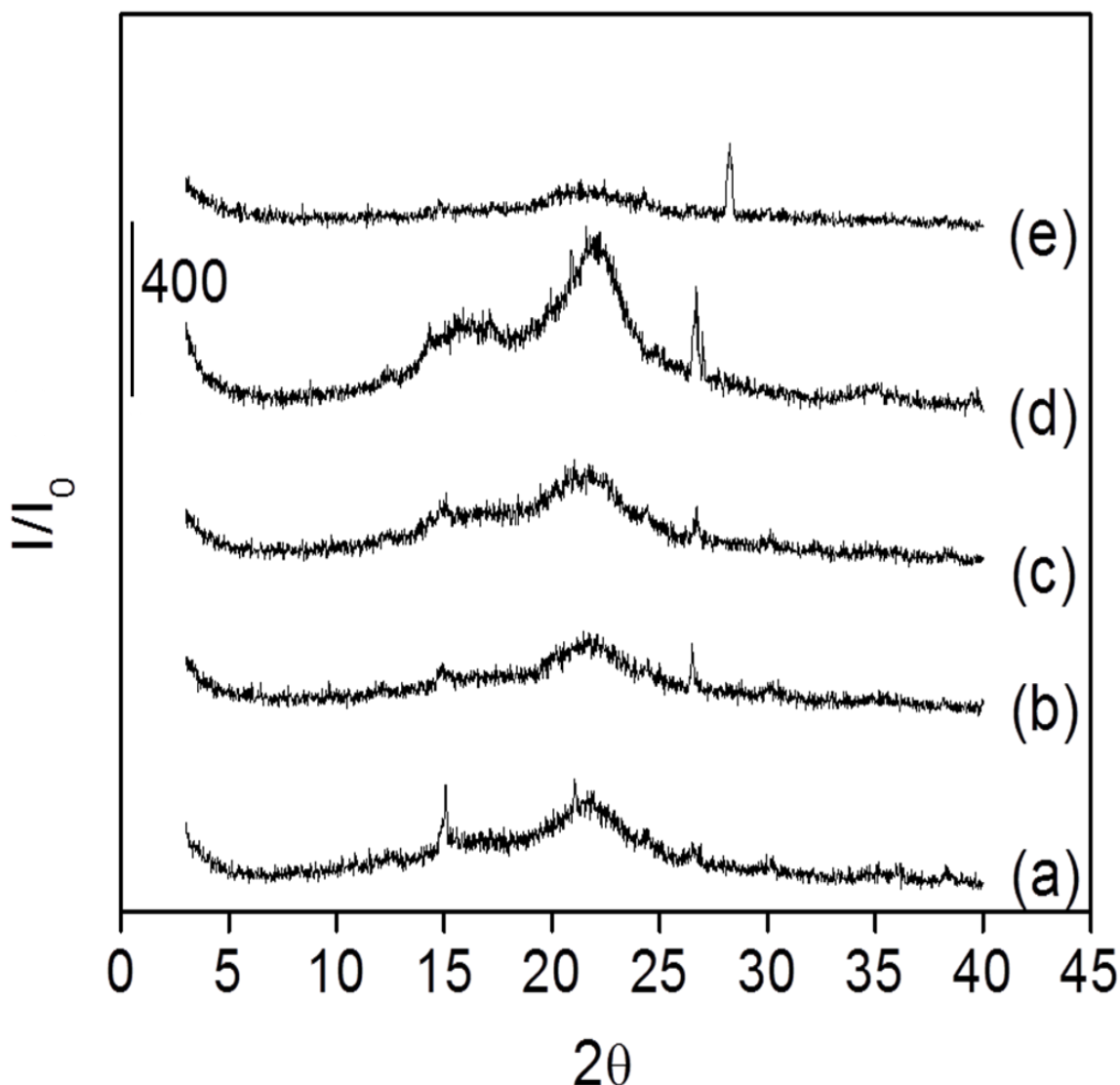


Figura 20 - Análise de difração de raio-X do aguapé pré-tratado com (a) ácido sulfúrico; (b) ácido acético; (c) peróxido de hidrogênio; (d) água e (e) aguapé sem pré-tratamento.

A Figura 20 mostra que o aguapé sem pré-tratamento tem apenas um pico em torno de  $2\theta = 27^\circ$ . A equação de Buschle-Diller-Zeronian (Equação 11) permite calcular o grau de cristalinidade das amostras. A Tabela 13 apresenta estes índices.

$$IC = \left(1 - \frac{I1}{I2}\right) \times 100 \quad \text{Equação (11)}$$

Onde: I1 é a mínima intensidade referente ao material amorfo e I2 é a máxima intensidade referente ao pico de cristalinidade de gráfico.

Tabela 13 – Índice de cristalinidade do aguapé pré-tratado calculado pela Equação 8.

Pré-tratamento	IC (%)
Ácido Sulfúrico	46,44
Ácido Acético	48,54
Peróxido de Hidrogênio	45,60
Água	58,48
Aguapé <i>in natura</i>	20,48

Através da Tabela 13 pode-se observar que o índice de cristalinidade para o aguapé sem pré-tratamento é 20,48 %, resultado similar aos 21,63 % encontrado por Satyanagalakshmi *et al.*, (2011). Entretanto, o índice do ácido sulfúrico foi menor do que o encontrado na literatura de 52,9 %. Todos os IC dos pré-tratamentos apresentaram diferenças significativas do aguapé *in natura*, comprovando que os processos químicos alteraram as características da biomassa.

### 5.1.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise FTIR é utilizada para caracterizar os componentes da biomassa do aguapé com base em suas ligações químicas. No gráfico abaixo, Figura 21, são observados picos nas regiões de 3400 cm<sup>-1</sup>, 2900 cm<sup>-1</sup>, 1700 cm<sup>-1</sup> e 1050 cm<sup>-1</sup>. Yang *et al.*, (2007) descreveu que as bandas referentes às ligações químicas da celulose são 3400 - 3200 e 1050, a hemicelulose é indicada pela banda 1765 – 1715, e a lignina é indicada por 3 ligações referentes as bandas: 1270, 1430-1470 e 1450-1630.

Nessa análise, o pré-tratamento com ácido acético mostrou mais mudanças na biomassa, entretanto o gráfico da curva de FTIR mostra que essa alteração é devido a prováveis resquícios do ácido acético que permaneceu na amostra após a lavagem.

Conforme o gráfico da Figura 21 os pré-tratamentos com peróxido de hidrogênio e com água não apresentaram muitas alterações em comparação com o aguapé sem pré-tratamento. A curva referente ao pré-tratamento com ácido sulfúrico é a que apresenta uma maior diferença com relação à curva do aguapé *in natura*, indicando assim que este é o melhor pré-tratamento.

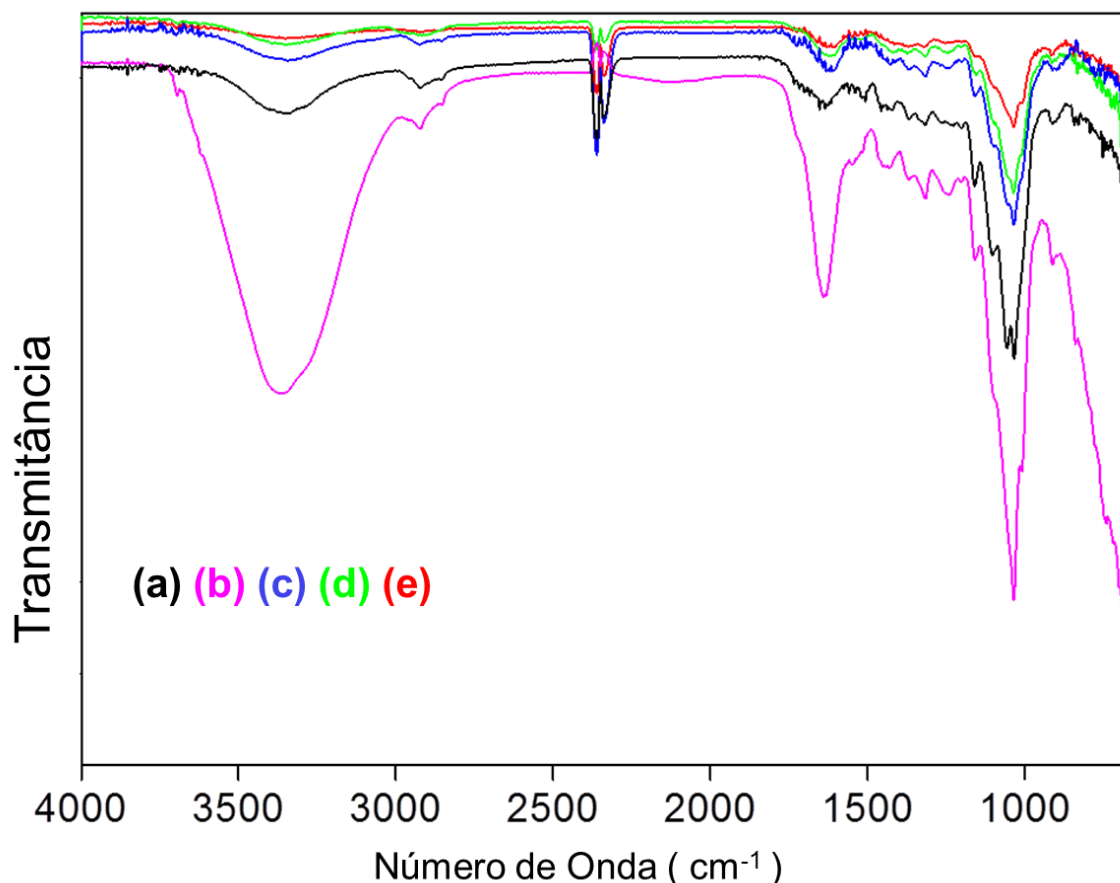


Figura 21 - análise de FTIR do aguapé pré-tratado com (a) ácido sulfúrico; (b) ácido acético; (c) peróxido de hidrogênio; (d) água e (e) aguapé sem pré-tratamento. O pico na banda de  $3400\text{cm}^{-1}$  representa a hidroxila (-OH);  $2900\text{cm}^{-1}$  é a ligação -CH;  $1700\text{cm}^{-1}$  representa qualquer acetila ou também pode ser ligações de éter urônicos de grupos carboxílicos nos ácidos ferúlico e ácidos p-cumárico, ambos os ácidos podem ser encontrados na lignina. A região do  $1050\text{cm}^{-1}$  indica normalmente a diminuição da biomassa por solubilização da hemicelulose (DAS *et al.*, 2015).

## 5.2 Produtividade do Etanol 2G com Aguapé como fonte de Biomassa

Para definir uma metodologia como a mais eficaz para um processo, é necessário encontrar a que apresente os melhores resultados com o menor gasto

de recursos. Para este trabalho, a metodologia mais eficaz é a que apresentar a melhor produtividade, ou seja, a que produzir o maior volume de etanol utilizando a menor quantidade de biomassa e no menor tempo possível.

Neste item são descritos os cálculos e os resultados para se encontrar a melhor metodologia para a produção de etanol 2G utilizando aguapé como matéria-prima, na intenção de solucionar o problema do excesso desta planta nos corpos hídricos. A apresentação dos resultados segue o fluxograma da Figura 22.

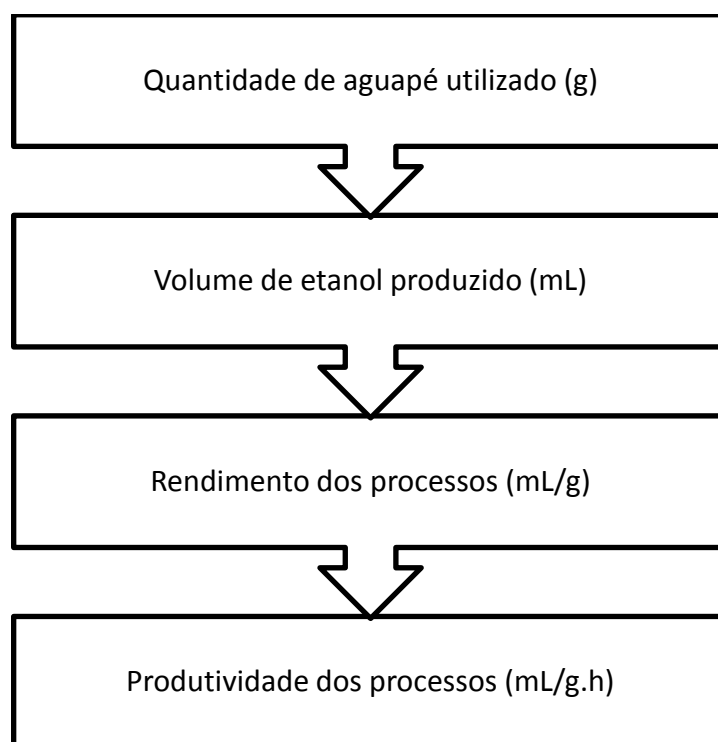


Figura 22 – Fluxograma das etapas para calcular a produtividade dos processos propostos.

Na realização das etapas de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica foram utilizados erlenmeyers, como biorreatores, e foram colocados aproximadamente 5g de biomassa seca em cada um, como apresentado pela Tabela 14.1. Na Tabela 14.2 é apresentado o estudo estatístico dos dados da Tabela 14.1.

Tabela 14.1 – Quantidade de biomassa de aguapé utilizada em cada biorreator

Biorreator	Pré tratamento	Umidade (%)	Teor de secos (%)	Massa úmida (g)	Massa seca (g)	Média massa seca (g)
1	Sem Pré-Tratamento	3,65	96,35	5,202	5,012	5,008
2				5,205	5,015	
3				5,192	5,002	
4				5,194	5,005	
5	Ácido Sulfúrico	1,99	98,01	5,109	5,007	5,005
6				5,105	5,004	
7				5,108	5,006	
8				5,106	5,005	
9	Ácido Acético	4,76	95,24	5,253	5,003	5,002
10				5,252	5,002	
11				5,251	5,001	
12				5,254	5,004	
13	Peróxido de Hidrogênio	5,98	94,02	5,321	5,003	5,004
14				5,323	5,005	
15				5,322	5,003	
16				5,323	5,004	
17	Água	3,83	96,17	5,206	5,006	5,007
18				5,203	5,004	
19				5,209	5,010	
20				5,207	5,007	

Tabela 14.2 – Estudo estatístico dos dados da Tabela 14.1 - Quantidade de biomassa de aguapé utilizada em cada biorreator

Biorreator	Pré tratamento	Média massa seca (g)	Desvio padrão	Erro padrão	Coef. variação	Coef. confiança	Limite inferior	Limite superior
1	Sem Pré-Tratamento	5,008	0,006	0,003	0,060	0,006	5,008	5,008
2								
3								
4								
5	Ácido Sulfúrico	5,005	0,002	0,001	0,015	0,001	5,005	5,005
6								
7								
8								
9	Ácido Acético	5,002	0,001	0,001	0,013	0,001	5,002	5,002
10								
11								
12								
13	Peróxido de Hidrogênio	5,004	0,001	0,001	0,011	0,001	5,004	5,004
14								
15								
16								
17	Água	5,007	0,002	0,001	0,025	0,002	5,007	5,007
18								
19								
20								

O processo de produção de etanol foi estudado de duas formas: hidrólise e fermentação separadas (SHF) e hidrólise e fermentação simultânea (SSF). As Tabelas 15.1 e 15.2 e a Figura 23 apresentam a quantidade de etanol produzido por meio desses processos.



Tabela 15.1 – Volume de etanol produzido nos processos separados e simultâneos.

Amostras	Processo	Pré tratamento	Etanol (mL)	Média Etanol (mL)
1	Hidrólise e Fermentação Separadas	Sem Pré-Tratamento	0,27	0,20
3			0,13	
5		Ácido Sulfúrico	0,67	0,67
7			0,67	
9		Ácido Acético	0,47	0,47
11			0,47	
13		Peróxido de Hidrogênio	0,60	0,54
15			0,47	
17		Água	0,13	0,20
19			0,27	
2	Hidrólise e Fermentação Simultâneas	Sem Pré-Tratamento	0,07	0,10
4			0,13	
6		Ácido Sulfúrico	0,54	0,57
8			0,60	
10		Ácido Acético	0,33	0,33
12			0,33	
14		Peróxido de Hidrogênio	0,27	0,24
16			0,20	
18		Água	0,20	0,20
20			0,20	

Tabela 15.2 – Estudo estatístico dos dados da Tabela 15.1 - Volume de etanol produzido nos processos separados e simultâneos.

Processo	Pré tratamento	Desvio padrão	Erro padrão	Coef. variação	Coef. confiança	Limite inferior	Limite superior
Hidrólise e Fermentação Separadas	Sem Pré-Tratamento	0,10	0,07	0,35	0,14	0,19	0,21
	Ácido Sulfúrico	0,00	0,00	0,00	-	-	-
	Ácido Acético	0,00	0,00	0,00	-	-	-
	Peróxido de Hidrogênio	0,09	0,07	0,12	0,13	0,53	0,54
	Água	0,10	0,07	0,35	0,14	0,19	0,21
Hidrólise e Fermentação Simultâneas	Sem Pré-Tratamento	0,04	0,03	0,30	0,06	0,10	0,10
	Ácido Sulfúrico	0,04	0,03	0,05	0,06	0,57	0,57
	Ácido Acético	0,00	0,00	0,00	-	-	-
	Peróxido de Hidrogênio	0,05	0,04	0,15	0,07	0,23	0,24
	Água	0,00	0,00	0,00	-	-	-

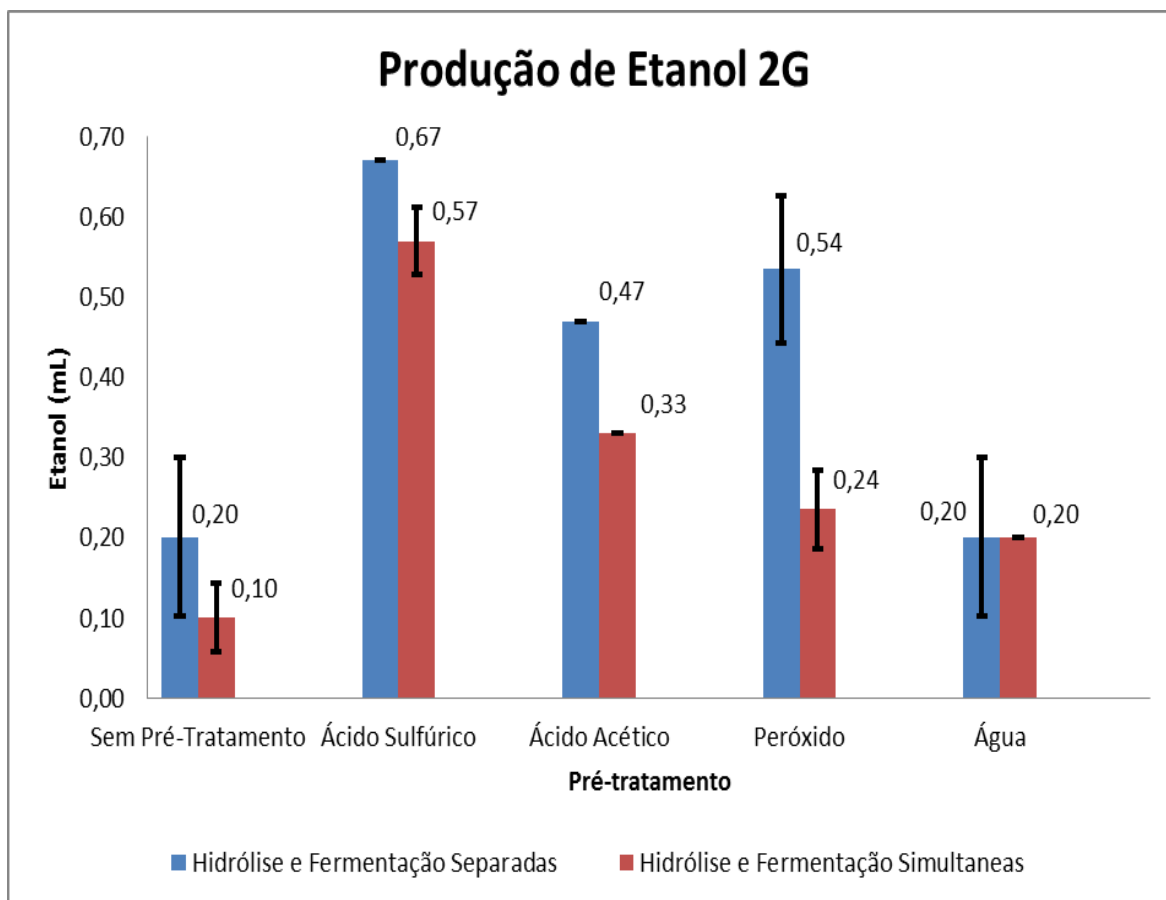


Figura 23 – Produção de etanol 2G nos processos SHF e SSF.

Os dados apresentados na Tabela 15.1 e no gráfico da Figura 23 mostram que para a produção de etanol 2G com aguapé o melhor processo é o da hidrólise enzimática e fermentação alcoólicas separadas. No pré-tratamento com água os valores foram iguais em ambos os processos e na metodologia que utiliza peróxido de hidrogênio o processo simultâneo (SSF) apresentou a metade do etanol produzido pelo separado (SHF). Essa diferença entre os resultados dos processos pode ser explicada pelo fato que o SHF trabalha nas condições ótimas de pH e temperatura, o que proporciona uma melhor atividade enzimática da celulase e uma melhor atividade metabólica (fermentação) da levedura, o mesmo não ocorre no processo SSF pois ele trabalha em uma faixa intermediária dos valores ótimos de pH e temperatura da enzima e do microrganismo fermentescível (SUN; CHENG, 2002)

Comparando os resultados do processo sem pré-tratamento com os que utilizam biomassa pré-tratada, é observado que as metodologias com hidrólise ácida e hidrólise com peróxido apresentaram melhores resultados na produção de etanol 2G,

entretanto na auto-hidrólise não há diferença com o processo sem pré-tratamento. Em uma comparação entre os valores gerados pelos pré-tratamentos, a metodologia que utiliza ácido sulfúrico apresentou o melhor resultado, 0,67mL para SHF e 0,57mL para SSF. Esse dado ajuda a confirmar os resultados encontrados nas análises de caracterização química: que esse processo de hidrólise química é o que mais retira lignina e hemicelulose da biomassa de aguapé, facilitando a atuação do complexo enzimático e produzindo um volume maior do produto.

Com os dados de quantidade de aguapé utilizado e volume de etanol produzido foi calculado o rendimento em mL/g dos processos. Por meio da densidade do etanol a razão em mL/g foi convertida em g/g (etanol/aguapé). A densidade do etanol é tabelada em função do volume de etanol na solução e na temperatura. Para este cálculo foi utilizado  $T=20^{\circ}\text{C}$ , pois é a temperatura em que o densímetro realiza a análise, e a densidade utilizada, conforme o volume, foi a descrita na tabela da ANVISA (ANVISA, 2010). As fórmulas utilizadas para os cálculos estão descritas nas Equações 9 e 10 e os resultados são apresentados nas Tabelas 16.1 e 16.2.

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Volume de etanol (mL)}}{\text{Massa seca de aguapé (g)}} \quad \text{Equação (9)}$$

$$\rho = \frac{m}{V} \quad \rightarrow \quad m = \rho \cdot V \quad \text{Equação (10)}$$

Tabela 16.1 – Rendimento em mL/g e g/g da produção de etanol 2G

Processo	Pré-tratamento	Massa aguapé (g)	Etanol (mL)	Densidade (g/mL)	Massa Etanol (g)	Média rendimento (mL/g)	Média rendimento (g/g)
Hidrólise e Fermentação Separadas	Sem Pré-Tratamento	5,01	0,20	0,998	0,20	0,04	0,04
	Ácido Sulfúrico	5,01	0,67	0,997	0,67	0,13	0,13
	Ácido Acético	5,00	0,47	0,997	0,47	0,09	0,09
	Peróxido de Hidrogênio	5,00	0,54	0,997	0,53	0,11	0,11
	Água	5,01	0,20	0,997	0,20	0,04	0,04
Hidrólise e Fermentação Simultâneas	Sem Pré-Tratamento	5,01	0,10	0,998	0,10	0,02	0,02
	Ácido Sulfúrico	5,00	0,57	0,997	0,57	0,11	0,11
	Ácido Acético	5,00	0,33	0,998	0,33	0,07	0,07
	Peróxido de Hidrogênio	5,00	0,24	0,998	0,23	0,05	0,05
	Água	5,01	0,20	0,998	0,20	0,04	0,04

Tabela 16.2 – Estudo estatístico dos dados da Tabela 16.1 - Rendimento em mL/g e g/g da produção de etanol 2G.

Processo	Pré tratamento	Média rendimento (mL/g)	Desvio padrão	Erro padrão	Coef. variação	Coef. confiança	Limite inferior	Limite superior
Hidrólise e Fermentação Separadas	Sem Pré-Tratamento	0,04	0,02	0,01	0,35	0,03	0,04	0,04
	Ácido Sulfúrico	0,13	0,00	0,00	0,00	-	-	-
	Ácido Acético	0,09	0,00	0,00	0,00	-	-	-
	Peróxido de Hidrogênio	0,11	0,02	0,01	0,12	0,03	0,11	0,11
	Água	0,04	0,02	0,01	0,35	0,03	0,04	0,04
Hidrólise e Fermentação Simultâneas	Sem Pré-Tratamento	0,02	0,01	0,01	0,30	0,01	0,02	0,02
	Ácido Sulfúrico	0,11	0,01	0,01	0,05	0,01	0,11	0,11
	Ácido Acético	0,07	0,00	0,00	0,00	-	-	-
	Peróxido de Hidrogênio	0,05	0,01	0,01	0,15	0,01	0,05	0,05
	Água	0,04	0,00	0,00	0,00	-	-	-

Como o volume de etanol na solução, em todos os processos, é inferior a 1%, a densidade deste álcool é similar a da água ( $\rho_{20} = 0,9982\text{g/mL}$ ). Também por esse motivo, de baixo teor alcoólico na solução, o valor da densidade de todos é aproximadamente 1g/mL, o que resulta que os dois rendimentos, em mL/g e g/g (etanol/aguapé), tenham os mesmos valores. Por isso na Figura 24 apenas um rendimento (mL/g) será apresentado.

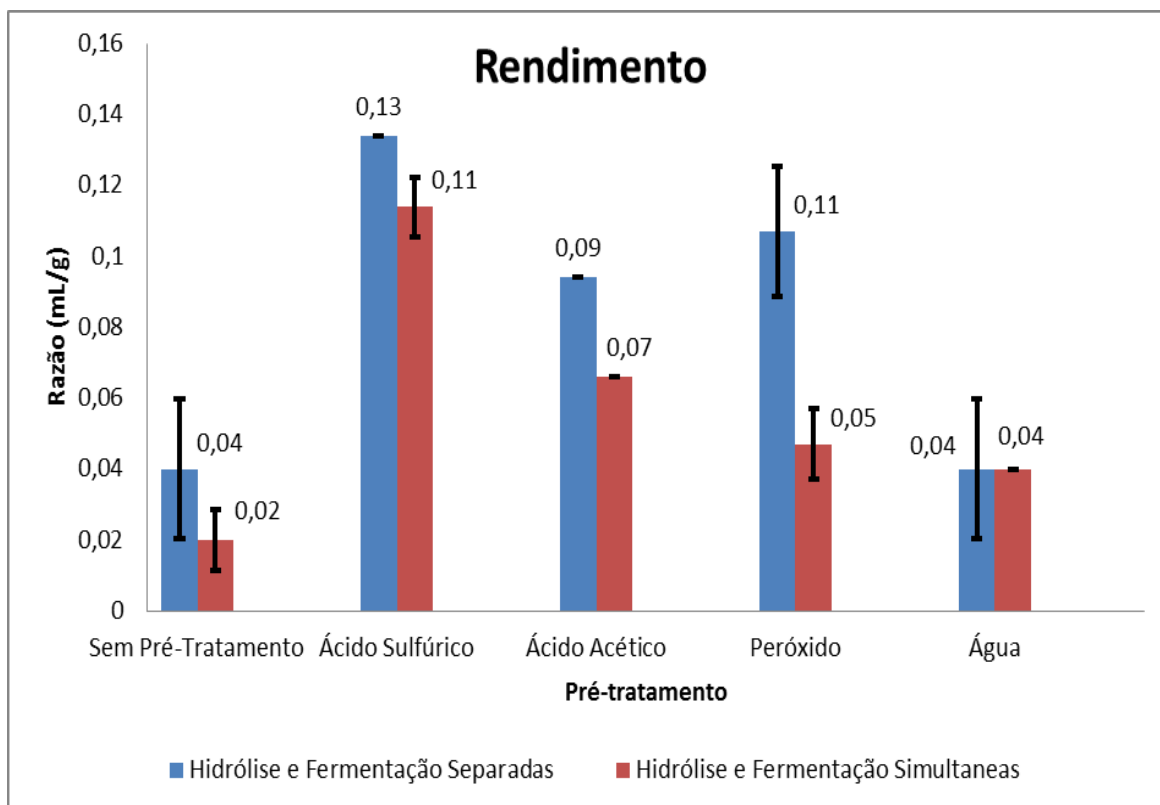


Figura 24 – Rendimento de etanol 2G separado por pré-tratamento e por processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica

Os dados apresentados na Tabela 16.1 e na Figura 24 mostram que o pré-tratamento que apresentou o melhor rendimento foi com ácido sulfúrico (0,13mL/g), seguido por peróxido de hidrogênio (0,11mL/g) e ácido acético (0,9mL/g). O pré-tratamento com água teve um resultado similar a metodologia sem pré-tratamento (0,4mL/g). Entre os processos analisados, o com hidrólise enzimática e fermentação alcoólica teve um rendimento melhor em quase todos os pré-tratamentos, apenas na auto-hidrólise os valores foram iguais em ambos os processos. Novamente, essa diferença entre os resultados pode ter ocorrido pelo fato do processo SSF não utilizar as condições ótimas de pH e temperatura.

Na literatura foram encontrados três trabalhos que utilizaram a *Eichhornia crassipes* como matéria prima para a produção de etanol lignocelulósico. Todos encontraram os melhores resultados utilizando o ácido sulfúrico no pré-tratamento da biomassa. Entretanto, a concentração do ácido variou entre os trabalhos. Nenhuma pesquisa utilizou a metodologia da hidrólise enzimática e fermentação simultâneas.

Também houve variações nos microrganismos fermentescíveis utilizados. A Tabela 17 compara os resultados obtidos e as principais diferenças entre eles.

Tabela 17 – Comparação dos resultados do rendimento com a literatura.

Artigos	Concentração H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%v/v)	Aguapé na solução de pré-tratamento (%p/v)	Rendimento (mg de etanol/mL de solução)	Principais diferenças
Resultados encontrados neste trabalho	1,0	15,0	7,0	-
SATYANAGALAKSHMI <i>et al.</i> , 2011	2,0	10,0	3,0	Hidrólise: Celulase - Zytex
DAS <i>et al.</i> , 2016	2,0	10,0	14,0	Fermentação: <i>S. cerevisiae</i> + <i>Z. mobilis</i>
ISARANKURA-NA-AYUDHYA, 2007	10,0	-	1,0	Fermentação: <i>C. shehatae</i> - fermenta xilose

Como mostrado na Tabela 17, o rendimento deste trabalho foi satisfatório quando comparado com o resultado de Satyanagalakshmi *et al.*, (2011), entretanto é a metade do valor encontrado por Das *et al.*, (2016), e esse resultado pode ser explicado pelo fato de terem utilizado dois microrganismos para a fermentação, a *S. cerevisiae*, levedura tradicional nos processos de produção de etanol e a bactéria *Z. mobilis*, que tem uma fermentação mais rápida e apresenta um rendimento em etanol maior que a *S. cerevisiae* (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009). Com o trabalho de Isarankura-na-ayudhya; Tantimongcolwat (2007) não é possível comparar os resultados pois ele utilizou um microrganismo que fermenta a xilose e não a glicose, entretanto é um dado interessante pois ele conseguiu produzir etanol com uma pentose presente no aguapé.

Para se calcular a produtividade de um processo é necessário dividir o rendimento pelo tempo gasto para a produção do produto. Nas metodologias propostas para este trabalho o tempo só é diferente nos processos SHF e SSF, pois no preparo da biomassa e no pré-tratamento todas as metodologias consomem o mesmo tempo.

Neste trabalho, o processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica em separado demora o dobro do tempo comparado com o processo de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica simultâneas. O primeiro tem um tempo total de 140h e o segundo de 70h. Entretanto, esses valores de tempo foram fixados para facilitar a comparação entre os rendimentos, para uma otimização do processo seria necessário um estudo do melhor tempo para cada processo. As Tabelas 18.1 e 18.2 e a Figura 25 apresentam os resultados do cálculo de produtividade, descrito na Equação 11.



$$Produtividade = \frac{Rendimento \left(\frac{mL}{g}\right)}{Tempo (h)} \quad \text{Equação (11)}$$

Tabela 18.1 – Produtividade (mL/g.h) da produção de etanol 2G

Processo	Pré-tratamento	Média rendimento (mL/g)	Tempo (h)	Média produtividade ( $\times 10^{-4}$ mL/g.h)
Hidrólise e Fermentação Separadas	Sem Pré-Tratamento	0,0399	140	2,85
	Ácido Sulfúrico	0,1338		9,56
	Ácido Acético	0,0940		6,71
	Peróxido de Hidrogênio	0,1069		7,64
	Água	0,0399		2,85
Hidrólise e Fermentação Simultâneas	Sem Pré-Tratamento	0,0200	70	2,85
	Ácido Sulfúrico	0,1139		16,27
	Ácido Acético	0,0660		9,42
	Peróxido de Hidrogênio	0,0470		6,71
	Água	0,0400		5,71

18.2 – Estudo estatístico dos dados da Tabela 18.1 - Rendimento em mL/g e g/g da produção de etanol 2G.

Processo	Pré tratamento	Média produtividade (x10 <sup>-4</sup> mL/g.h)	Desvio padrão	Erro padrão	Coef. variação	Coef. confiança	Limite inferior	Limite superior
Hidrólise e Fermentação Separadas	Sem Pré-Tratamento	2,85	0,0001	0,0001	0,3492	0,0002	0,0003	0,0003
	Ácido Sulfúrico	9,56	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0010	0,0010
	Ácido Acético	6,71	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0007	0,0007
	Peróxido de Hidrogênio	7,64	0,0001	0,0001	0,1216	0,0002	0,0008	0,0008
	Água	2,85	0,0001	0,0001	0,3497	0,0002	0,0003	0,0003
Hidrólise e Fermentação Simultâneas	Sem Pré-Tratamento	2,85	0,0001	0,0001	0,3009	0,0002	0,0003	0,0003
	Ácido Sulfúrico	16,27	0,0001	0,0001	0,0526	0,0002	0,0016	0,0016
	Ácido Acético	9,42	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0009	0,0009
	Peróxido de Hidrogênio	6,71	0,0001	0,0001	0,1489	0,0002	0,0007	0,0007
	Água	5,71	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0006	0,0006

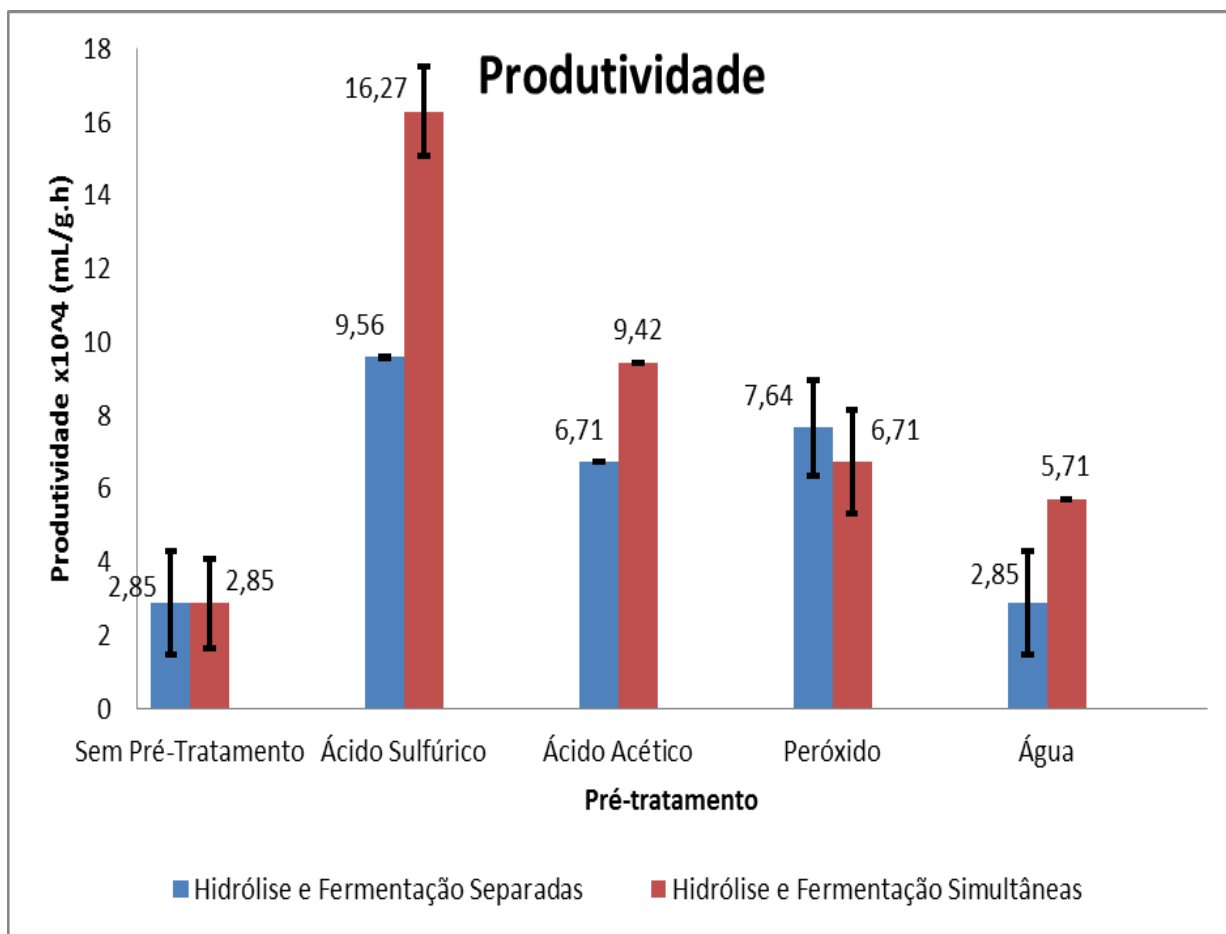


Figura 25 – Produtividade ( $\times 10^4$  mL/gh) da produção de etanol 2G

A Tabela 18.1 e a Figura 25 apresentam que o processo mais produtivo é o simultâneo. Isso acontece pois a produtividade é inversamente proporcional a variável tempo, ou seja, quando o tempo do processo diminui a sua produtividade aumenta. Entretanto, no pré-tratamento com peróxido o processo SHF é mais produtivo que o SSF, porém a diferença entre os dois valores é pequeno. Entre as metodologias propostas, novamente, a com ácido sulfúrica é a mais produtiva, tendo uma produtividade cinco vezes maior que a metodologia do aguapé sem pré-tratamento. Confirmam-se assim os resultados das análises anteriores que mostram esse pré-tratamento como o mais eficiente e, também, que é necessário a etapa de pré-tratamento da biomassa de aguapé antes do processo de hidrólise enzimática, facilitando o acesso do complexo enzimático às fibras celulósicas.

### 5.2.1 Comparação entre o Rendimento do Etanol 2G de Aguapé com Outras Produções de Etanol

Para um processo industrial o rendimento é medido em litros de etanol/toneladas de biomassa (L/t). Para o aguapé o rendimento foi calculado em mililitros de etanol/gramas de aguapé seco (mL/g) por isso são necessários duas transformações, a primeira de unidade e a segunda de aguapé seco para aguapé natural, e este contém apenas 3% de matéria seca. Para os cálculos foi utilizado o resultado do processo com melhor produtividade: pré-tratamento com ácido sulfúrico seguido de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica simultâneas.

Rendimento etanol/aguapé seco: 0,11mL/g  $\rightarrow$  110L/t.

Rendimento etanol/aguapé natural: 0,0033mL/g  $\rightarrow$  3,3L/t.

Em 1 hectare crescem 220kg de aguapé por dia, portanto em 1 ano há uma produção de 80 toneladas de *Eichornia crassipes* (BAYRAKCI; KOÇAR, 2014; DAS *et al.*, 2016). Com essa taxa seria possível produzir, em 1 ano, aproximadamente 265L de etanol por cada hectare de aguapé presente nos corpos hídricos. Essa produção, que segue o conceito de “erradicação através da utilização”, seria interessante para diminuir os problemas causados pelo excesso de aguapé nos rios e lagos.

Para comparação a Tabela 19 apresenta o rendimento (L/t) das principais fontes mundial de produção de etanol. O milho tem um rendimento maior quando comparado com a cana-de-açúcar, entretanto a quantidade de tonelada de milho produzida por hectare é 22 vezes menor que a produzida por cana-de-açúcar, além de que o processo de produção de etanol a partir de uma fonte amilácea é mais complexo e tem maior custo que um processo com uma fonte açucareira como matéria-prima (MACHADO; ABREU, 2006).

Tabela 19 – Rendimento da produção etanol de diferentes matérias-primas.

Matéria prima	Tipo de biomassa	Rendimento etanol/biomassa (L/t)
Aguapé	Celulósica	3,3
Aguapé seco	Celulósica	130
Cana-de-açúcar	Açucareira	85 (1G) + 45 (2G) = 130
Beterraba	Açucareira	100
Milho	Amilácea	350

Fonte: ( MACHADO; ABREU, 2006; ANDRIETTA, 2009; SOBRINHO, 2012)

## 6 CONCLUSÃO

Neste contexto, conclui-se que a melhor metodologia encontrada para a produção de etanol de segunda geração por meio de *Eichornia crassipes* (aguapé) é a hidrólise com ácido sulfúrico combinada com explosão a vapor, seguida dos processos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica simultâneas.

Por fim, este estudo concluiu que é possível utilizar o conceito de “erradicação através da utilização”, que é quando não se consegue de nenhuma forma controlar ou acabar com uma praga e esta passa a ser usada como matéria prima para algum processo, como a produção do etanol de segunda geração, utilizando a biomassa do aguapé como matéria-prima. Portanto, esta tecnologia é uma alternativa favorável para minimizar os problemas ambientais e econômicos causados pelo excesso de *Eichornia crassipes* (aguapé) nos rios brasileiros.

Contudo, este trabalho é o estudo inicial da utilização da biomassa de aguapé para a produção de etanol de segunda geração e é necessário mais pesquisas para conseguir aperfeiçoar este processo, otimizando-o e o tornando mais produtivo e economicamente viável. Uma das pesquisas importantes é o estudo dos tempos dos processos de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica separadas e simultâneas. Outro estudo interessante é utilizar a bioágua no processo, ou seja, não eliminar a água, presente no aguapé, na etapa de preparo da biomassa. Também, pode-se avaliar outras formas mais simples, economicamente viáveis e sustentáveis de pré-tratamento, como a utilização de menos água e insumo químico na etapa de pré-tratamento, além de averiguar a necessidade do processo de lavagem com acetona, e estudar a utilização de uma porcentagem maior de biomassa no processo de pré-tratamento.

## 7 BIBLIOGRAFIA

ANDRIETTA, S. R. **Optimal Industrial Fermentation**. BioContal. BIOEN - FAPESP. 2009

ANVISA. **Alcoometria - Tabelas Alcométricas**. Agência Nacional Vigilância Sanitária, p. 11, 2010.

AZEVEDO NETTO, J. M. Novos conceitos sobre a eutrofização. **Revista DAE**, v. 48, p. 28, 1988.

BAYRAKCI, A. G.; KOÇAR, G. Second-generation bioethanol production from water hyacinth and duckweed in Izmir: A case study. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 306–316, 2014.

BERGIER, I. *et al.* Pyrolysis dynamics of biomass residues in hot-stage. **Bioresources**. v. 10, n. 4, p. 7604–7617, 2015.

BRASIL, B. S. A. F. Microalgas : a 3<sup>a</sup> geração de biocombustíveis no Brasil. **Embrapa-Energia**, p. 3, 2016.

BRESSIANI, J. **CANA--ENERGIA: Melhoramento genético da cana-de-açúcar com foco na biomassa**, GranBio, 2016.

CARVALHO, S. A. D. DE; FURTADO, A. T. O Melhoramento genético de cana-de-açúcar no Brasil e o desafio das mudanças climáticas globais. **Revista**

**Gestão e Conexões**, v. 2, n. 1 - jan/jun, p. 22–46, 2013.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedade e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

COTANA, F. et al. Production of bioethanol in a second generation prototype from pine wood chips. **Energy Procedia**, v. 45, p. 42–51, 2014.

DAS, A. *et al.* Production of bioethanol as useful biofuel through the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 70, 2016.

DAS, S. *et al.* Sustainable Materials and Technologies Optimization of enzymatic saccharification of water hyacinth biomass for bio-ethanol: Comparison between artificial neural network and response surface methodology. **Susmat**, v. 3, p. 17–28, 2015.

EMBRAPA. Etanol 2G depende do aprimoramento de enzimas. **Portal Embrapa - Agroenergia**, p.3, 2014.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis*: Um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 361–380, 2009.

FENGEL, D.; WEGENER, G.. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Walter de Gruyter: New York, 1989

GANGULY, A.; CHATTERJEE, P. K.; DEY, A. Studies on ethanol production from water hyacinth - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 1, p. 966–972, 2012.

GAO, Y. *et al.* Physicochemical, pyrolytic, and combustion characteristics of hydrochar obtained by hydrothermal carbonization of biomass. **BioResources**. v. 11, n. 2, p. 4113–4133, 2016.



GONÇALVES JR, A. C.; SELZLEIN, C.; NACKE, H. Uso de biomassa seca de aguapé (*Eichornia crassipes*) visando a remoção de metais pesados de soluções contaminadas. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 31, n. 1, p. 103–108, 2009.

GOULD, J. M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 225–231, 1985.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores de desenvolvimento sustentável do Brasil: 2012. **Estudos e Pesquisas - Informação Geográfica**, p. 350, 2012.

IONASHIRO, M. **Giolito - Fundamentos de Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial / Calorimetria Exploratória Diferencial**. Araraquara: Giz Editorial, p. 98. 2004.

ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C; TANTIMONGCOLWAT, T. Original article: Appropriate Technology for the Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to Liquid Ethanol: Future Prospects for Community Strengthening and Sustainable Development. **EXCLI Journal**, v. 6, n. May, p. 167–176, 2007.

JONKER, J. G. G. *et al.* Outlook for ethanol production costs in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies. **Applied Energy**, v. 147, p. 593–610, 2015.

KLOCK, U. *et al.* **Química da Madeira**. 3ª Edição revisada. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, p.86, 2005.

LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. **Bioresource Technology**, v. 165, n. C, p. 3–8, 2014.

LÓPEZ-LINARES, J. C. *et al.* Experimental study on ethanol production from hydrothermal pretreated rapeseed straw by simultaneous saccharification and fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p.

104–110, 2014.

LU, J.; SHEAHAN, C.; FU, P. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. **Energy Environ. Sci.**, v. 4, n. 7, p. 2451–2466, 2011.

MACHADO, C. M. M.; ABREU, F. R. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. **Política Agrícola**, v. 15, p. 64–78, 2006.

MAHMOOD, Q. *et al.* Anatomical studies on water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) under the influence of textile wastewater. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 6, n. 10, p. 991–8, 2005.

MANFRINATO, E. S.; O Aguapé - Fatos e Fofocas. In: Fundação Salin Farah Maluf. **Problemas Ambientais Brasileiros**. p. 109-112, 1991.

NELSON, D. L.; COX, M. M. A Glicólise e o Catabolismo das Hexoses. In: WH FREEMAN AND COMPANY (Ed.). . **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3<sup>a</sup> edição ed. New York. p. 409–440.

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

OLIVEIRA, M. Entre açúcares e genes. **Revista Fapesp**, p. 86–91, 2012.

PACHECO, T. F. Produção de etanol: primeira ou segunda Geração? **Embrapa - Circular Técnica**, p. 6, 2011.

PATEL, S. I.; PATEL, N. G. Production of bioethanol using water hyacinth , an aquatic weed , as a Substrate. **Environmental and Social Sciences**, v. 2, n. 1, p. 2–6, 2015.

PETROBRAS. Curso de formação de operadores de refinaria - Processo de refino. **Equipe Petrobras**. p. 76. Curitiba, 2002.

PITARELO, A. *et al.* Effect of moisture content in the steam treatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1502–1509, 2012.

POLUIÇÃO FAZ AUMENTAR QUANTIDADE DE AGUAPÉ NO RIO TIETÊ. **Jornal Hoje**, São Paulo: Rede Globo, 15 de agosto de 2015. Programa de TV - Jornal.

REZANIA, S. *et al.* The diverse applications of water hyacinth with main focus on sustainable energy and production for new era: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 943–954, 2015.

ROMITELLI, M. S. Remoção de Fósforo em efluentes secundários com emprego de macrofitas aquáticas do gênero *Eichhornia*. **Revista DAE**, 1983.

SANTOS, F. A. *et al.* Potencial da palha de cana-de-aucar para produção de etanol. **Química nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SATYANAGALAKSHMI, K. *et al.* Bioethanol production from acid pretreated water hyacinth by separate hydrolysis and fermentation. **BioResources**, v. 70, n. FEBRUARY, p. 156–161, 2011.

SILVA, R. *et al.* Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1436–1441, 2009.

SOBRINHO, P. Processo (simplificado) de produção de etanol de milho. p. 8, 2012.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621–1651, 2008.

TASKER, S. *et al.* Hydroxyl accessibility in celluloses. **Polymer**,

v. 35, n. 22, p. 4717–4721, 1994.

TÉLLEZ, T. R. *et al.* The water hyacinth, *Eichhornia crassipes*: an invasive plant in the Guadiana River Basin (Spain). **Aquatic Invasions**, v. 3, n. 1, p. 42–53, 2008.

ÚNICA. Produção e uso do etanol combustível no Brasil - Respostas às questões mais frequentes. **União da Indústria de Cana-de-açúcar**, p. 70, São Paulo, 2007.

YANG, H. *et al.* Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v. 86, n. 12-13, p. 1781–1788, 2007.

ZANCHETTA, A. Celulases e suas aplicações. **Mundo das Leveduras**. UNESP: Rio Claro, 2013.