

GLÁUCIA KOVALSKI



**OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO
DO GLICEROL E DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE PAPEL**

**MESTRADO EM
BIOENERGIA**

GUARAPUAVA-PR

2015

GLÁUCIA KOVALSKI

**OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO GLICEROL E DE
RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE PAPEL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues

Orientador

GUARAPUAVA-PR

2015

GLÁUCIA KOVALSKI

**OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DO GLICEROL E DE
RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE PAPEL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 02 de abril de 2015.

Prof. Dr. André Lazzarin Gallina – UFES

Prof(a). Dr(a). Graciela Inêz Bolzon de Muniz – UFPR

Prof. Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues

Orientador

GUARAPUAVA-PR

2015

*Dedico aos meus queridos pais,
Libio e Maria de Lurdes.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, porque nada em nossa vida faz sentido se não for por Ele, e pela certeza de ter sempre me acompanhado.

Aos meus pais, Libio e Maria de Lurdes, pela compreensão, paciência, carinho e pelo exemplo de vida e caráter que sempre me deram.

À minha Mana Vivi, ao cunhado Gelson, e aos meus ursos João Pedro e Mariana, obrigada por fazerem a minha vida mais feliz.

Ao Henrique, porque nós dois sabemos como essa caminhada não foi fácil, mas a sua companhia me ajudou a ser mais forte, agradeço o carinho e paciência em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Paulo Rogério, pela orientação, oportunidade, amizade e incentivo em todos esses anos de convivência.

À Professora Dra. Cynthia Beatriz Fürstenberger pela disponibilidade do laboratório de microbiologia para realização desse trabalho, e pela ajuda no desenvolvimento do mesmo.

Ao Professor Dr. André Lazzarin Gallina pelas contribuições.

Ao Flávio e ao Zinho do laboratório de microbiologia de águas pelo apoio e pela ajuda com as amostras.

Ao Douglas Kais e ao pessoal do laboratório de combustíveis, Japonês e Priscila pelo auxílio com as análises físico-químicas.

Ao Guilherme Maia pela ajuda com o MEV.

Ao Professor Dr. Everson pela colaboração no decorrer do mestrado.

A Flávia pelas caronas para as aulas, pelas boas conversas e pela amizade.

A Marilei pela oportunidade de aprendizado, pela amizade e pelo incentivo.

À NOVATEC/UNICENTRO pela disponibilidade do espaço físico para realização do trabalho.

A todos que, contribuíram de alguma maneira com o desenvolvimento desse trabalho, muito obrigada!

À Indústria Ibema Papel Cartão por ceder o resíduo lignocelulósico utilizado no projeto.

À CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE EQUAÇÕES	iii
LISTA DE SIGLAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Energia	4
3.1.1 Tipos de energia e a sociedade	4
3.2 Matriz energética mundial	5
3.3 Matriz energética brasileira	7
3.4 Combustíveis fósseis	8
3.4.1 Petróleo	8
3.4.2 Carvão mineral	9
3.4.3 Gás natural	10
3.5 Emissão de poluentes	11
3.6 Combustíveis renováveis	13
3.6.1 Biodiesel	15
3.6.2 Etanol	16
3.7 Resíduos industriais com potencial energético	17
3.7.1 Glicerol coproduto do biodiesel	17
3.7.2 Resíduos lignocelulósicos	22
3.8 Biotecnologia	25
3.9 Bactéria <i>Escherichia coli</i>	27
3.9.1 Características fisiológicas da <i>E. coli</i>	28
3.9.2 Características bioquímicas da <i>E. coli</i>	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Local do experimento	32
4.2 Cultivo da bactéria <i>Escherichia coli</i>	32
4.2.1 Determinação de UFC (Unidades formadoras de colônia)	32
4.3 Obtenção da matéria prima	33
4.4 Preparo do glicerol	34
4.5 Caracterização do glicerol	34
4.5.1 Análise físico-química	34
4.6 Preparo da Fibra lignocelulósica	34
4.7 Caracterização da Fibra lignocelulósica	34
4.7.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)	34
4.7.2 Composição Elementar	35
4.7.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	35
4.8 Estudos preliminares	35
4.9 Planejamento experimental	36
4.10 Fermentação	36
4.11 Destilação	37
4.12 Quantificação do teor de etanol no destilado bruto	38
4.12.1 Soluções empregadas	38

4.12.2	Curva padrão	38
4.12.3	Preparo das amostras e procedimento de leitura.....	39
4.13	Análise estatística.....	40
4.14	Caracterização e análise físico-química do etanol	40
4.14.1	Cromatografia.....	40
4.14.2	Aspecto e cor visual.....	40
4.14.3	Massa específica a 20 °C e teor alcoólico	41
4.14.4	Potencial hidrogeniônico (pH).....	41
4.14.5	Condutividade elétrica.....	41
4.15	Cinética da fermentação.....	41
4.15.1	Determinação da concentração bacteriana.....	43
4.15.2	Determinação do °Brix	44
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Caracterização do glicerol.....	45
5.1.1	Análise físico-química	45
5.2	Caracterização da Fibra lignocelulósica	45
5.2.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR).....	45
5.2.2	Composição Elementar	46
5.2.3	Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV.....	47
5.3	Quantificação do teor de etanol no destilado bruto.....	49
5.4	Cromatografia do etanol	57
5.5	Análise físico-química do etanol obtido	57
5.6	Cinética da fermentação microbiológica.....	58
6.	CONCLUSÕES	64
7.	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	65
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Oferta total de energia primária no mundo (IEA, 2014).	6
Figura 2. Oferta total de energia primária no Brasil (EPE, 2014 a).....	7
Figura 3. Emissões de gases de efeito estufa no Brasil (MCTI, 2014).	12
Figura 4. Transesterificação de óleos vegetais (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).	18
Figura 5. Rota metabólica da degradação de glicerol por <i>E. coli</i> (GONZALEZ, et al., 2008).	20
Figura 6. Rotas de aproveitamento da biomassa (VIDAL; HORA, 2011).	23
Figura 7. Estrutura de uma célula procariótica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).	28
Figura 8. Vias metabólicas da fermentação por <i>E. coli</i> (MARTÍNEZ; BENNETT; SAN, 2010).	30
Figura 9. Técnica de plaqueamento (WILLEY; SHERWOOD; WOOLVERTON, 2008).	33
Figura 10. Amostras do inóculo.	37
Figura 11. Aparelho de destilação simples.	37
Figura 12. Curva de calibração/UV-VIS.	39
Figura 13. Amostras preparadas para análise.	39
Figura 14. Câmara de Neubauer (CECCATO-ANTONINI, 2010).	43
Figura 15. Espectro de IR da fibra lignocelulósica.	46
Figura 16. Imagem gerada por micrografia eletrônica de varredura (MEV) da fibra lignocelulósica.	47
Figura 17. Imagem de micrografia com mapeamento por EDS da fibra lignocelulósica.	48
Figura 18. Espectro de EDS da fibra lignocelulósica.	48
Figura 19. Superfície de resposta para o planejamento inicial.	50
Figura 20. Superfície de resposta para o segundo planejamento.	52
Figura 21. Superfície de resposta para o terceiro planejamento.	54
Figura 22. Atividade enzimática no processo de fermentação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).....	55
Figura 26. Velocidade específica de crescimento celular (μ) no processo de fermentação.	60
Figura 27. Comportamento da concentração de açúcares ($^{\circ}$ Brix) em função do tempo.	60
Figura 28. Velocidade específica do consumo de açúcares ($^{\circ}$ Brix) (μ_s).	61
Figura 29. Comportamento da concentração da produção de produto em função do tempo.	62
Figura 30. Velocidade específica da formação de produto (μ_p).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades do glicerol (HAYNES, 2012).....	19
Tabela 2. Produtos finais de fermentações microbianas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).....	27
Tabela 3. Meio de cultura para <i>Escherichia coli</i> (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).	29
Tabela 4. Planejamento experimental inicial.	36
Tabela 5. Análise físico-química do glicerol.	45
Tabela 6. Teores de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N), enxofre (S) e oxigênio (O).	46
Tabela 7. Valores do teor de etanol no destilado bruto.	49
Tabela 8. Tabela ANOVA para os ensaios do processo de fermentação do planejamento inicial.	50
Tabela 9. Segundo planejamento experimental.	51
Tabela 10. Tabela ANOVA para os ensaios do processo de fermentação do segundo planejamento.	52
Tabela 11. Terceiro planejamento experimental.....	53
Tabela 12. Tabela ANOVA para os ensaios do processo de fermentação do terceiro planejamento.	54
Tabela 13. Melhores condições de produção de etanol.	56
Tabela 14. Análise físico-química do álcool gerado (ensaios 6 e 9 da Tabela 11).	58

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo de UFC do inóculo base.....	32
Equação 2. Determinação teor de etanol.....	40
Equação 3. Velocidade específica de crescimento celular.....	42
Equação 4. Velocidade específica máxima de crescimento celular.....	42
Equação 5. Velocidade específica de consumo de substrato.....	42
Equação 6. Velocidade específica de formação de produto.....	43
Equação 7. Determinação do número total de células.....	44
Equação 8. Determinação da viabilidade celular.....	44
Equação 9. Representação do modelo estudado.....	57

LISTA DE SIGLAS

1,2 PDO - 1,2-propanodiol
ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADH - Acetaldeído / Álcool Desidrogenase
ADN - Ácido Desoxirribonucleico
ADP - Difosfato de Adenosina
ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica
ANP - Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM - American Society for Testing and Materials
ATCC - American Type Culture Collection
ATP - Adenosina Trifosfato
BEN - Balanço Energético Nacional
BRACELPA - Associação Brasileira de Celulose e Papel
CENBIO - Centro Nacional de Referência em Biomassa
CG-DIC - Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama
DAHQ - Dihidroxiacetona Quinase
EDS - Energia Dispersiva
EPE - Empresa de Pesquisa Energética
EUA - Estados Unidos da América
FHL - Formato de Hidrogênio Liase
gliDH - Glicerol Desidrogenase
IAA - Instituto do Açúcar e Álcool
IEA - International Energy Agency
IGBP - Intergovernmental Geosphere-Biosphere Programme
IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change
LAG - Fase de adaptação
LOG – Fase exponencial
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
MDA - Ministério do Desenvolvimento Agrário
MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura
MME - Ministério de Minas e Energia
NAD(P)H - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Hidreto
NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH - Forma reduzida de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NBR - Norma Brasileira (aprovada pela ABNT)
OMS - Organização Mundial da Saúde
OPEP - Organização dos Países Exportadores de Petróleo
PCI - Poder Calorífico Inferior
PCS - Poder Calorífico Superior
PCU - Poder Calorífico Útil
PHL - Piruvato Formato Liase
PNUMA - Programa das Nações Unidas para o Ambiente
UFC - Unidades Formadoras de Colônia
UV-VIS - Ultravioleta Visível
WEC - World Energy Council
WMO - World Meteorological Organization

RESUMO

KOVALSKI, Gláucia. **Obtenção de etanol a partir da fermentação do glicerol e de resíduos da indústria de papel.** 2015. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO. Guarapuava - PR. 2015.

A produção de biocombustíveis pode ocorrer a partir de diversas matérias primas, como por exemplo, de glicerol e de resíduos da indústria de papel. O glicerol é o principal coproduto da produção do biodiesel, e por ser uma excelente fonte de carbono, pode ser aproveitado por microrganismos para realizar fermentação anaeróbica e convertê-lo em etanol. Os resíduos da biomassa de indústrias de papel apresentam como principal composto a celulose, que pode ser empregada em processos de fermentação como fonte de carbono. Com isso, o presente trabalho tem como objetivo produzir etanol a partir da fermentação anaeróbica do glicerol e de resíduos da indústria de papel pela bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922. Para determinação de UFC (unidades formadoras de colônia) foi utilizada a técnica de plaqueamento e diluição em série. O número total de células foi estimado pelo método de contagem em câmara de Neubauer. O glicerol foi caracterizado por análises físico-químicas de pH, condutividade, densidade, aspecto e cor visual. A fibra lignocelulósica foi caracterizada por Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR), composição elementar e MEV (Microscopia eletrônica de Varredura). Foi utilizado planejamento experimental multivariado 2^2 com ponto central. O processo de fermentação foi realizado em sistema fechado por 72 h a $36^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, de forma anaeróbica. O concentrado fermentado foi destilado em aparelho de destilação simples e quantificado o teor de etanol no destilado bruto pelo método de UV-VIS (NBR 13920). A presença de etanol foi confirmada por análise de Cromatografia Gasosa (CG-DIC). O etanol obtido foi caracterizado por análises físico-químicas. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o software Design-Expert®. Os resultados mostraram tendência de maior produção de etanol utilizando 2 g de fibra lignocelulósica e 4 mL de bactéria *E. coli*. Os maiores teores de etanol obtido foram de 83 e 81 °GL. O trabalho demonstrou ser possível produzir etanol a partir da fermentação microbológica de glicerol e fibra lignocelulósica, com baixo custo no processo, e aproveitamento de resíduos excedentes no meio ambiente.

Palavras-Chave: *Escherichia coli*, resíduos lignocelulósicos, biocombustível.

ABSTRACT

KOVALSKI, Gláucia. **Obtaining ethanol from the fermentation of glycerol and residue from the paper industry.** 2015. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO. Guarapuava - PR. 2015.

Biofuels production may occur from various raw materials, for example, from glycerol and waste of paper industry. Glycerol is the main byproduct of biodiesel production, and for being an excellent source of carbon, can be availed by microorganisms to perform anaerobic fermentation and convert it into ethanol. The paper industries biomass waste has the cellulose as a main compost which can be used in fermentation processes as a source of carbon. Therefore, this study aims to produce ethanol from anaerobic fermentation of glycerol and waste from the paper industry by the bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922. For determination of CFU (colony forming units) the plating technique and serial dilution was used. The total cell number was estimated by the method of counting in a Neubauer chamber. Glycerol was characterized by physical-chemical analysis of pH, conductivity, density, appearance and visual color. The residual fiber was characterized by Spectroscopy Infrared Region (IR), elemental composition and SEM (scanning electron microscopy). A multivariate 2^2 experimental design with a central point was used. The fermentation process was accomplished in a closed system for 72 hours at $36\text{ °C} \pm 0.5$, anaerobically. The fermented concentrate was distilled in a simple distillation apparatus and quantifies the content of ethanol in the crude distillate by UV-VIS method (NBR 13920). The presence of ethanol was confirmed by gas chromatography analysis (GC-FID). Ethanol obtained was characterized by physical-chemical analysis. The statistical analysis was performed using the software Design-Expert®. The results indicated a trend of increased ethanol production using 2 g of cellulosic material and 4 mL of bacteria *E. coli*. The highest concentration of ethanol obtained were 83 and 81 ° GL. The work showed to be possible to produce ethanol from microbial fermentation of glycerol and cellulosic wastes with low cost in the process, and use of surplus waste in environment.

Key Words: *Escherichia coli*, cellulosic waste, biofuels.

1. INTRODUÇÃO

Sustentar o conforto ao qual a sociedade atual está acostumada a viver requer elevada quantidade de energia, sendo a maior parte dessa energia proveniente de matéria-prima não renovável, de origem fóssil, na maioria das vezes o petróleo (CUSHION; WHITEMAN; DIETERLE, 2010).

O uso em larga escala do petróleo tem um limite, não somente por ser uma fonte não renovável, a qual tende a esgotar no futuro, mas também pelo acúmulo de gases produzidos na combustão desses produtos, os quais causam severos danos ambientais ao planeta. A atual busca por fontes renováveis de energia é incentivada pelas mudanças climáticas causadas pelo efeito estufa, esgotamento de reservas de combustíveis fósseis, e a busca por desenvolvimento econômico e social cada vez mais exigente (WEC, 2010).

Diversas pesquisas sobre novas fontes energéticas, principalmente de origem renovável, vêm sendo desenvolvidas. Os biocombustíveis são produzidos a partir de fontes da biomassa, caracterizando-se como alternativa aos combustíveis fósseis. Podem ser obtidos de matérias-primas vegetais ou animais. As matérias-primas vegetais são provenientes de óleos vegetais de plantas como soja, canola, dendê, girassol, mamona, entre outros. As matérias-primas animais provem do sebo suíno, bovino ou de aves. Outras fontes são os resíduos agrícolas e industriais, os quais também podem ser utilizados como matéria prima, visando o emprego desses subprodutos no processo de geração de energia (WEC, 2010; LEITE; CORTEZ, 2012; GALLINA et al., 2012).

O etanol é um combustível considerado limpo e renovável, por não possuir enxofre em sua estrutura, quando sofre combustão não libera gases poluentes, como SO_2 (g) e SO_3 (g), causadores da chuva ácida. É utilizado no Brasil desde 1970, quando em virtude da crise do petróleo, foi estimulado o desenvolvimento de outros combustíveis em substituição à gasolina, caracterizando-se como o Programa Nacional do Álcool (Pró-álcool), sendo o Brasil um dos primeiros países a utilizar esse tipo de combustível (LEITE; CORTEZ, 2012; MAIA et al., 2013).

Dentre os vários gêneros de biomassa que podem ser utilizadas para geração de biocombustíveis, os resíduos lignocelulósicos se mostram como uma matéria-prima interessante, visto que o acúmulo desses resíduos aumenta a cada ano e os custos dos mesmos são baixos. Na maioria das vezes, parte dos rejeitos é queimada e outra parcela é removida para aterros inadequados (ROSA; GARCIA, 2009; BANERJEE et al., 2010).

Os materiais lignocelulósicos são formados por carboidratos, proteínas, sais minerais, compostos fenólicos, e polissacarídeos, que correspondem a cerca de 90% do seu peso seco. Sabe-se que esses resíduos contêm elevado teor de celulose, fator este importante para se tornar matéria-prima na produção de etanol de segunda geração, e na maioria das vezes não necessita de pré-tratamento, uma vez que já passou por deslignificação das polpas no processo de obtenção da celulose (KHANG; WANG; LEE, 2010).

Além de resíduos lignocelulósicos, outros subprodutos industriais podem ser utilizados na produção do etanol, como por exemplo, o glicerol, principal coproduto da produção do biodiesel (10% do total). Em virtude dos estímulos para que ocorra a geração de biodiesel, o mesmo vem sendo produzido em larga escala, o que gera preocupação ambiental e econômica, visto o excesso de glicerol produzido no processo. O glicerol bruto apresenta em sua composição impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual, e não pode ser descartado na natureza, nem utilizado de modo direto nos setores de farmácias e de cosméticos (HU; WOOD, 2010; KOVALSKI et al., 2013).

Na produção de biodiesel é usado óleo vegetal ou gordura animal, sendo este um triéster derivado da glicerina. O óleo vegetal sofre uma reação de transesterificação mediante a ação de um catalisador e na presença de metanol ou etanol, formando três moléculas de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos, o que constitui o biodiesel, liberando uma molécula de glicerol (KNOTHE, 2010; MOTA; PESTANA, 2011).

Essa sobrecarga de glicerol se caracteriza como um gargalo na cadeia produtiva do biodiesel, e pesquisas relacionadas ao assunto vem sendo estimuladas. Entre essas pesquisas a conversão do glicerol em compostos de maior valor agregado é considerada uma aplicação promissora. O glicerol pode ser convertido a partir da fermentação microbológica em diversos compostos como 1,3 - propanodiol, di-hidroxiacetona, etanol, biogás e succinato (VARRONE, 2013; RIVALDI et al., 2008).

A fermentação é um conjunto de reações químicas, controladas por enzimas, em que ocorre a degradação de moléculas orgânicas em compostos mais simples e a consequente liberação de energia. A bactéria *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885) é um dos microrganismos capazes de produzir etanol a partir da fermentação microbológica (SUHAIMI, et al., 2012; HERRMANN, et al., 2013; LAU, et al., 2010).

Dessa forma, o presente trabalho tem como finalidade produzir etanol por fermentação anaeróbica com a bactéria *Escherichia coli* utilizando-se como substratos resíduos da indústria de papel e glicerol residual do biodiesel.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Produzir etanol a partir do processo de conversão microbiológica de glicerol e de fibra lignocelulósica da indústria de papel por fermentação anaeróbica com a bactéria *Escherichia coli*.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a aplicabilidade da bactéria *Escherichia coli* na conversão microbiológica do glicerol e da fibra lignocelulósica da indústria de papel em etanol;
2. Determinar os parâmetros em que a conversão microbiológica do glicerol e da fibra lignocelulósica é mais eficiente para produção de etanol;
3. Quantificar e analisar as propriedades físico-químicas do etanol produzido a partir da conversão microbiológica do glicerol e da fibra lignocelulósica da indústria de papel.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Energia

A palavra Energia é derivada do termo grego *Energeia*, que pode ser definida como a capacidade de realizar trabalho. A fonte primária de energia é o Sol, o qual transfere energia para os vegetais através da fotossíntese, e esta energia química é armazenada na forma de açúcares e amido. Outras fontes consideradas primárias de energia são as de origem fóssil, como o carvão, o petróleo e o gás natural, fontes geotérmicas e fontes nucleares, urânio e plutônio. Além das fontes primárias, existem as fontes secundárias de energia, as quais se desenvolvem a partir das fontes primárias, como por exemplo, a energia hidráulica, eólica, os alimentos e a madeira (TIAGO FILHO, 2007).

A evolução da sociedade está diretamente interligada com o desenvolvimento da energia, no princípio o homem apropriou-se do fogo para satisfazer suas primeiras necessidades como alimentação, iluminação e aquecimento. Conforme as exigências de conforto e eficácia de trabalho aumentaram surgiram diferentes formas de energia, que com o passar do tempo foram sendo aperfeiçoadas (GOLDEMBERG; JOHN, 2010).

3.1.1 *Tipos de energia e a sociedade*

Os tipos de energia podem ser não renováveis (petróleo, carvão, gás natural) e renováveis (energia solar, eólica, biomassa, hidráulica, geotérmica, células combustíveis). As fontes não renováveis precisaram de milhões de anos para se formar, e não podem ser repostas, sendo fontes finitas de energia, além de apresentarem influência negativa ao meio ambiente por serem altamente poluentes. As energias renováveis são consideradas fontes inesgotáveis de energia, podem ser repostas rapidamente e emitem menos gases poluentes no meio ambiente se comparado aos combustíveis fósseis, contribuindo com a preservação ambiental (TIAGO FILHO, 2007).

A Revolução Industrial entre os séculos XVIII e XIX marca o início de uma nova etapa na história, baseada primeiramente no carvão mineral, sendo o primeiro combustível fóssil utilizado em larga escala. Posteriormente inicia-se a exploração do petróleo, o qual ultrapassou o carvão e se tornou o principal combustível da revolução energética, principalmente pelo surgimento dos automóveis. Mais tarde grandes descobertas

aconteceram, o fenômeno da energia elétrica foi elucidado, e em 1882 foram construídas as primeiras usinas geradoras por Thomas Edison (FARIAS; SELLITTO, 2011).

Na década de 1970 ocorreu a crise petrolífera, onde conflitos econômicos e ambientais colocaram em questão o uso indiscriminado do petróleo, e os impactos ambientais relacionados aos combustíveis fósseis. A partir de então surge um processo de mudança na matriz energética, com a busca por fontes de energia renováveis, limpas e eficientes, que se preocupam com o meio ambiente e os impactos climáticos (RODRIGUES; COSTA, 2012).

No mundo moderno a energia é fundamental no desenvolvimento de todos os países, afeta diretamente a vida de bilhões de pessoas, e se caracteriza como a essência que impulsiona a economia. Fontes seguras de energia estimulam o desenvolvimento das nações, e tem papel direto na modernização e expansão da indústria, da agricultura, do comércio e dos transportes. Através dos avanços energéticos foi possível prosperar em todos os aspectos da vida humana, como na medicina, na comunicação, nos transportes e na educação (EXXON MOBIL, 2014).

Mesmo a energia sendo a principal fonte do desenvolvimento mundial, as consequências associadas a sua produção não podem ser ignoradas. Diante da situação climática e ambiental vivida nos dias de hoje, torna-se necessário reconsiderar a matriz energética mundial. Analisando os avanços tecnológicos no campo da geração de energia é possível enxergar um panorama mais responsável, que visa utilizar em maior proporção recursos de fontes renováveis e limpas, pensando nos aspectos sociais, ambientais e econômicos (TESKE, 2013).

3.2 Matriz energética mundial

A produção e o consumo de combustíveis atingiram níveis recordes de aceleração, com exceção da energia nuclear, em aspectos globais o consumo de energia cresceu mais rapidamente que a produção, 2,3% no ano de 2013. Aproximadamente 80% do aumento de consumo global de energia é responsabilidade dos países emergentes. O crescimento nos EUA foi de 2,9%, enquanto o consumo na União Europeia, no Japão e na Espanha teve queda de 0,3%, 0,9% e 5%, respectivamente (BP ESTATISTICAL, 2014).

De acordo com o relatório da IEA (International Energy Agency) Key World Energy Statistics 2014, em relação à oferta total de energia primária no mundo, os combustíveis fósseis representam 81,7% da matriz energética global, energia nuclear 4,8%, já a

participação de energias renováveis corresponde 13,5% (IEA, 2014).

Na Figura 1 observa-se a oferta total de energia primária no mundo segundo o relatório Key World Energy Statistics IEA de 2014.

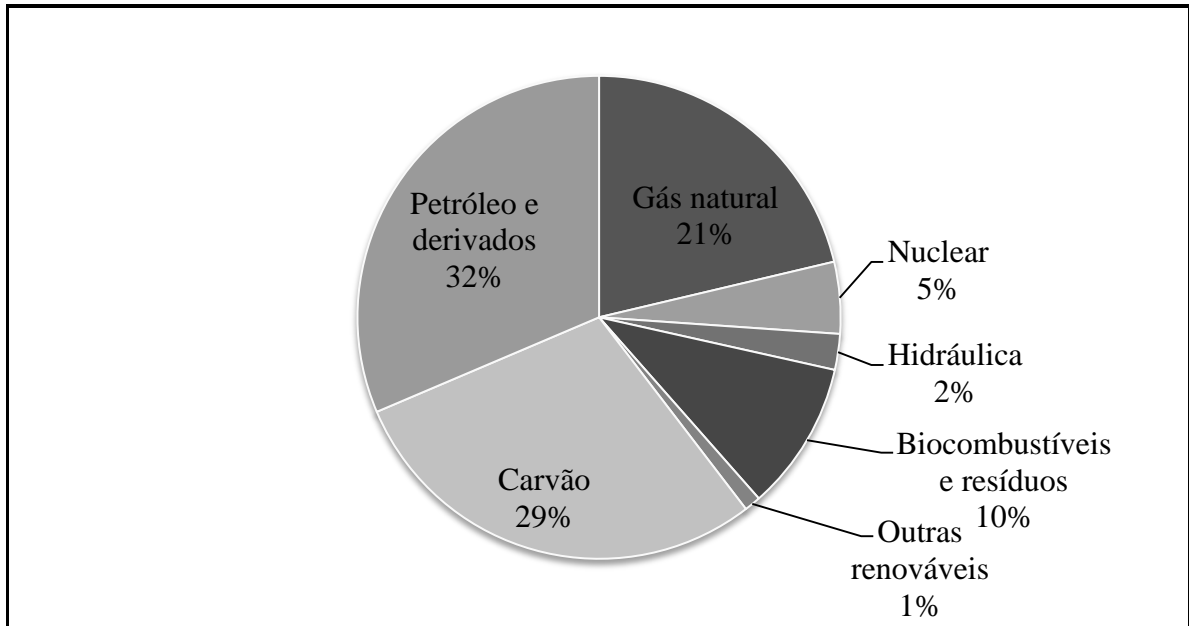


Figura 1. Oferta total de energia primária no mundo (IEA, 2014).

O petróleo continua sendo a principal fonte de energia no mundo, representando 31,4% do total ofertado. Em sequência está o carvão mineral com 29% e o gás natural com 21,3% do total de energia primária. A energia a partir de biocombustíveis e resíduos representam 10% do total no mundo, a energia hidráulica 2,4% e outras fontes como geotérmica, eólica e solar somam 1,1% (IEA, 2014).

Estima-se que até 2040 a população mundial aumentará de 7 bilhões para aproximadamente 9 bilhões, como consequência a economia global irá duplicar e a demanda energética aumentar em torno de 35%. A China e a Índia serão responsáveis pela maior parte desse desenvolvimento, são os países com maior população mundial e estima-se um crescimento ainda maior nas próximas décadas (EXXON MOBIL, 2014).

A demanda de energia sempre será impulsionada pelo crescimento populacional e as necessidades econômicas e sociais. Nas duas últimas décadas a população mundial cresceu 1,5 bilhão e a disponibilidade de energia para todas as pessoas ainda é um problema a ser enfrentado. Em países como a África e a Ásia a eletricidade está muito abaixo da demanda no

resto do mundo, e além do bem-estar, aspectos básicos de saneamento, saúde e educação são afetados pela falta de energia (WEC, 2013).

3.3 Matriz energética brasileira

Segundo o Relatório Síntese do BEN 2014 (Balanço Energético Nacional), no ano de 2013 registrou-se 4,5% de crescimento na oferta total de energia no país, sendo 80% deste acréscimo proveniente do gás natural, petróleo e seus derivados. Este fato se deve a queda na oferta interna de hidroeletricidade, consequentemente aumentando a geração térmica e a utilização de gás natural, carvão mineral e óleo (EPE, 2014 a).

Na Figura 2 verifica-se a Oferta Interna de Energia no Brasil conforme o BEN 2014, ano base 2013.

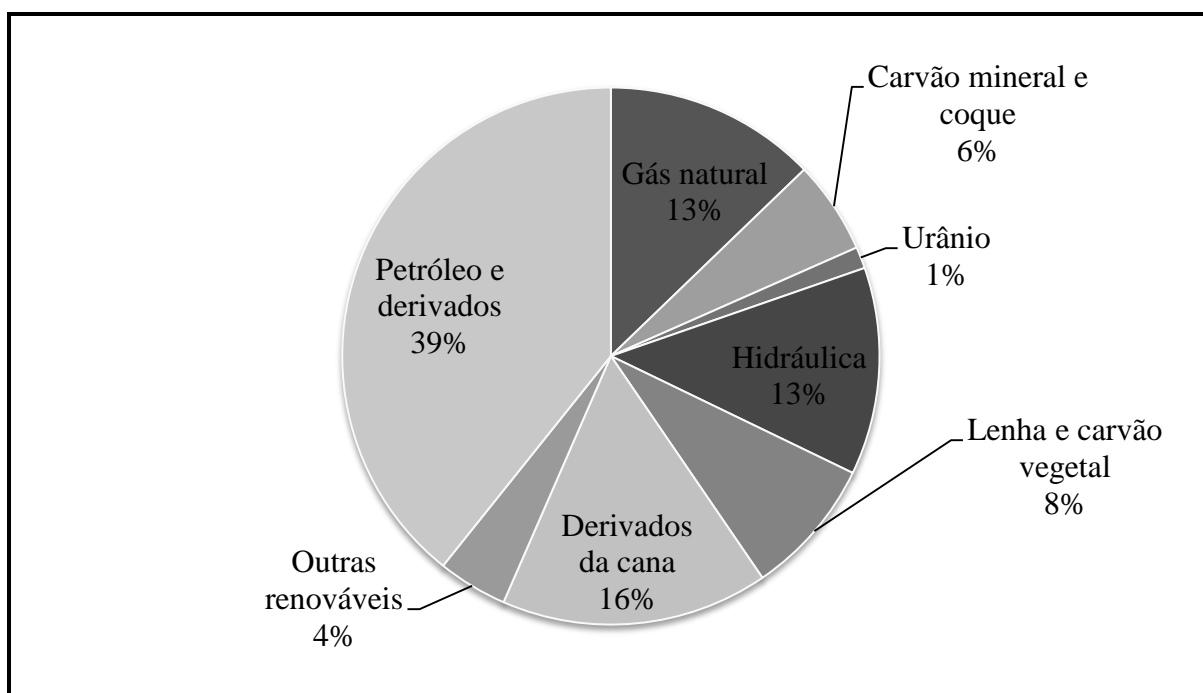


Figura 2. Oferta total de energia primária no Brasil (EPE, 2014 a).

No Brasil 41% da matriz energética é representada por fontes renováveis, sendo 12,5% de energia hidráulica, 8,3% de lenha e carvão vegetal, 16,1% a partir de derivados da cana e 4,2% de outras fontes renováveis. Petróleo e derivados somam 39,3%, gás natural 12,5%, carvão mineral e coque 5,6% e urânio 1,3% (EPE, 2014 a).

Em 2013 a Oferta Interna de Energia no país alcançou o total de 296,2 Mtep (milhões de toneladas equivalentes de petróleo), sendo o setor de transportes o principal destaque por esse crescimento, contribuindo com 4,1 Mtep. A produção de etanol cresceu 17,6% e o consumo subiu 19,9% comparado ao ano de 2012, esse desenvolvimento se deve também ao fato do governo ter estipulado o aumento de 20 para 25% na quantidade de álcool anidro na gasolina (EPE, 2014 b).

A queda na oferta de energia hidráulica está ligada aos aspectos climáticos que interferiram no funcionamento das usinas hidrelétricas, chegando a 5,4% de declínio no ano de 2013. As questões hídricas levaram a uma queda na proporção de renováveis na matriz elétrica, de 84,5% para 79,3%. A energia eólica teve grande participação na geração de energia elétrica, atingiu 2.202 MW, e aumento de 30,2% na participação (EPE, 2014 b).

Mesmo com todos os esforços para renovar a matriz energética, os combustíveis fósseis continuam sendo as principais fontes de energia no mundo, mesmo sendo mais poluentes do que combustíveis renováveis, leva-se em consideração a maior eficiência energética e questões econômicas mundiais (WEC, 2013).

3.4 Combustíveis fósseis

Aproximadamente 80% da energia consumida no mundo são provenientes da combustão de fontes fósseis. Esses combustíveis são meios eficazes para produzir energia, mas são recursos finitos, apresentam instabilidade econômica e são altamente poluentes (BORSATO; GALÃO; MOREIRA, 2005).

Os principais combustíveis fósseis utilizados nos dias atuais são o petróleo, o carvão mineral e o gás natural (IEA, 2014).

3.4.1 Petróleo

Em estado líquido o petróleo é uma substância oleosa, de cheiro característico, inflamável e menos densa que a água. É formado por uma mistura de hidrocarbonetos originados da decomposição da matéria orgânica depositada por milhões de anos principalmente no fundo dos mares, sob a ação de pressão, temperatura, bactérias e pouco oxigênio. O petróleo é constituído por centenas de compostos químicos, que podem ser separados por ebulição (THOMAS, 2004).

O uso de petróleo e seus derivados vêm sendo empregados desde o início da chamada petroquímica, substituindo outros materiais como a madeira, o concreto, e até metais. A sociedade se adaptou facilmente aos benefícios advindos do petróleo, sendo utilizado em larga desde o século passado. Apesar de ser um recurso não renovável, é a principal fonte de energia no mundo, possui alto poder calorífico, serve como matéria prima para produção de produtos como pneus, tintas, resinas, chicletes, entre outros (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

O volume de petróleo produzido no mundo aumentou 0,64% no ano de 2013, aproximadamente 550,8 mil barris/dia. Os países que não fazem parte da Opep (Organização dos Países Exportadores de Petróleo) registraram alta de 2,35%, enquanto os países que fazem parte da Opep apresentaram queda de 1,6%. A Arábia Saudita continua sendo o maior produtor mundial de petróleo, a Rússia vem em segundo lugar e o Brasil está na 13ª posição, após queda de 1,9%, chegando a um total de 2,1 milhões de barris/dia, o que representa 2,5% do total mundial (ANP, 2014).

Conforme o Anuário, no ano de 2013 o consumo mundial de petróleo chegou a um total de 91,3 milhões de barris/dia, tendo alta de 1,6%. Os Estados Unidos foi o país que mais consumiu petróleo no ano de 2013, com 18,9 milhões de barris/dia, depois a China com 10,8 milhões de barris/dia e o Brasil segue na 7ª colocação com 3 milhões de barris/dia, correspondendo a 3,2% do total mundial (ANP, 2014).

3.4.2 Carvão mineral

O carvão mineral é constituído por matéria orgânica decomposta ao longo de milhões de anos, em condições adequadas de pressão, temperatura e oxigênio. Consiste em uma associação de nitrogênio, enxofre, carbono e outros elementos como siltito, folhelhos, diamictitos e pirita. A qualidade do carvão é determinada pelo poder calorífico, ou seja, a capacidade de produzir calor, medido em kcal/kg. O poder calorífico é definido pela proporção de carbono e compostos rochosos e minerais. O carvão de alta qualidade apresenta maior quantidade de carbono, enquanto elementos rochosos e minerais diminuem a qualidade do carvão (ANEEL, 2009).

A utilização do carvão mineral na produção de vapor para o funcionamento de máquinas foi um dos motores que impulsionou a Primeira Revolução Industrial, a qual teve início na Inglaterra no século XVIII. Posteriormente, no fim do século XIX o vapor

proveniente do carvão mineral começou a ser utilizado na produção de energia elétrica, mas com o tempo, e a invenção de motores a explosão, acabou perdendo espaço para o petróleo e o gás natural. Nos anos 70, principalmente pela crise do petróleo, o interesse pelo carvão mineral ressurgiu, e é amplamente utilizado até os dias de hoje (ANEEL, 2009).

No ano de 2013 o consumo mundial de carvão para energia primária representou 30,1%, o maior valor registrado desde o ano de 1970. A China é responsável por 67% do crescimento global do consumo de carvão, mesmo crescendo abaixo da média. A Índia está em segundo lugar, sendo responsável por 21% do crescimento global. A produção de carvão global cresceu 0,8%, valor menor do que o registrado desde o ano de 2002 (BP ESTATISTICAL, 2014).

No Brasil o carvão vapor (maior teor de cinzas) é utilizado para geração de energia elétrica, o qual possui origem nacional, sendo produzido nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No ano de 2013 a demanda de carvão vapor no Brasil para energia elétrica aumentou 59,1% em relação ao ano de 2012. O carvão metalúrgico (nobre) apresentou queda de 3,0% no consumo do setor siderúrgico em virtude da atenuação da produção física de aço bruto no ano de 2013 (EPE, 2014 a).

Atualmente o carvão supre cerca de um quarto da energia mundial, sendo o mais abundante entre os combustíveis fósseis e o que mais gera emissão de gases poluentes, alcançando no mínimo 800g de CO₂/kWh na queima em usinas termelétricas. Acredita-se que até o ano de 2050 o mundo consuma 40% das reservas previstas de carvão, portanto, o emprego desse combustível ainda pode persistir por muitos anos (TESKE, 2013).

3.4.3 Gás natural

O gás natural consiste em uma mistura de hidrocarbonetos gasosos, provenientes da decomposição de matéria orgânica fossilizada ao decorrer de milhões de anos. É composto basicamente por metano, com concentrações variadas de outros elementos como etano, propano, butano, nitrogênio, gás carbônico, ácido clorídrico, metanol, água, entre outros. A composição final do gás natural vai depender das condições do reservatório e de variáveis naturais no processo de formação (ANEEL, 2009).

A utilização do gás natural é ampla, sendo empregado nos setores industrial, residencial, comercial e de serviços. Serve tanto para gerar energia elétrica, como também em motores de combustão, produção de chamas, vapor e calor. Em comparação aos demais

combustíveis fósseis o gás natural apresenta baixa emissão de gases poluentes, rápida dispersão e baixos teores de contaminantes (ANEEL, 2009).

De acordo com o documento BP Statistical Review of World Energy 2014, o consumo global de gás natural aumentou 1,4% em 2013, valor abaixo da média de 2,6%. A produção de gás natural no mundo teve alta de 1,1% e os Estados Unidos seguem como o maior produtor mundial (BP ESTATISTICAL, 2014).

No Brasil a produção média diária de gás natural no ano de 2013 foi de 77,2 milhões de m³/dia e a proporção importada foi de 46,5 milhões de m³/dia. Foi registrado um acréscimo de 47,6% na geração térmica a partir do gás natural, chegando a 69,0 TWh. O gás natural empregado na geração de energia elétrica apresentou aumento de 57,8%, em média 42,7 milhões m³/dia (EPE, 2014 a).

Em virtude da disponibilidade e aplicabilidade do gás natural como fonte energética de queima limpa, a expansão da produção e consumo desse combustível será capaz de alavancar a economia e contribuir com as metas ambientais propostas para os próximos anos (EXXON MOBIL, 2014).

A emissão de poluentes está diretamente relacionada à combustão dos combustíveis fósseis, e estes são responsáveis por grande parte dos problemas ambientais e de saúde que acometem o planeta e a sociedade na atualidade (EPE, 2014 c).

3.5 Emissão de poluentes

De acordo com o relatório anual da WMO 2014 (World Meteorological Organization), os anos de 2012 e 2013, foram os que mais apresentaram acúmulo de CO₂ na atmosfera desde o ano de 1984. A concentração de CO₂ na atmosfera atingiu 396 ppm (partes por milhão) em 2013, sendo a taxa mais elevada dos últimos 30 anos. A pesquisa relata que o aumento na taxa de CO₂ não é consequência apenas das emissões, mas se deve também a queda na absorção de carbono pela biosfera (WMO, 2014 a; OLANYK et al., 2014).

A interferência do homem sobre o clima é evidente, pesquisas apontam que as emissões antrópicas de gases do efeito estufa são as mais altas da história. As mudanças climáticas acarretaram danos globais generalizados, tantos sociais como ambientais. O aumento da temperatura da Terra é real, os oceanos e a atmosfera estão mais quentes, a proporção de neve e gelo diminuiu, e o nível do mar está aumentando. As emissões de CO₂ provenientes de combustíveis fósseis e processos industriais foram responsáveis por

aproximadamente 78% do aumento das emissões, chegando a 32 GtCO₂ no ano de 2010, crescendo mais 2% em 2012 (IPCC, 2014).

O aumento médio global da temperatura é quase diretamente proporcional às emissões de dióxido de carbono acumuladas. Nas três últimas décadas a temperatura da Terra aumentou progressivamente, o período que compreende de 1983 a 2012 provavelmente foi o mais quente dos últimos 800 anos. Os gases do efeito estufa contribuíram com 0,5 °C a 1,3 °C no aquecimento na Terra entre 1951 a 2010. A temperatura média da Terra é de 14° C, estima-se que um aumento de mais 2 °C traria graves consequências ao ambiente (IPCC, 2014).

De acordo com o relatório Estimativas Anuais de Emissões de Gases de Efeito Estufa 2014, organizado pelo MCTI (Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação), no Brasil o total das emissões no ano de 2012 foi de 1,2 bilhão de toneladas de CO₂eq. Segundo as estimativas do relatório as emissões diminuíram 41,1% entre os anos de 2005 e 2012 (MCTI, 2014).

Na Figura 3 observa-se as emissões brasileiras de gases de efeito estufa no ano de 2012 em GgCO₂eq por setor.

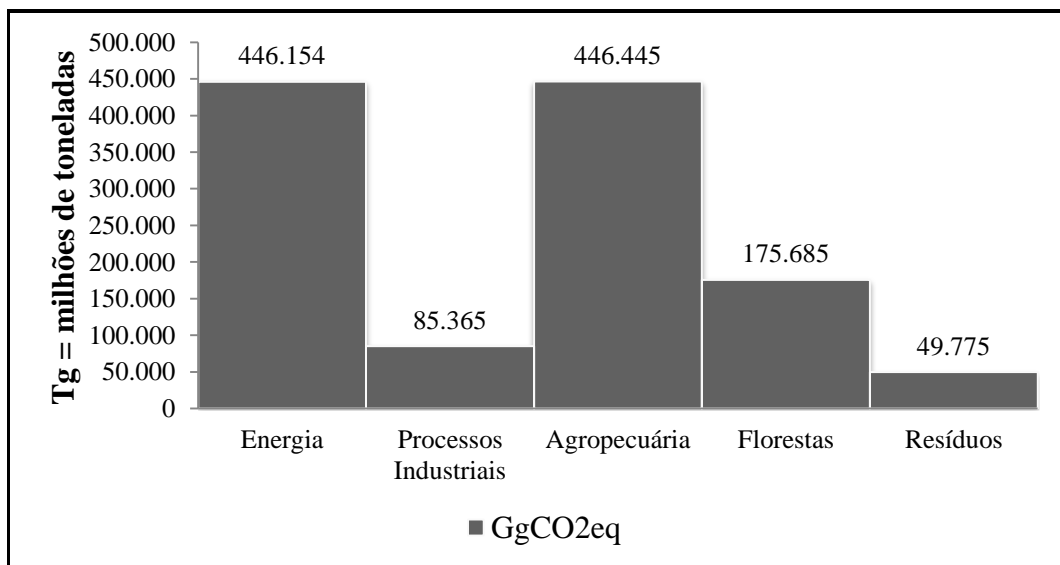


Figura 3. Emissões de gases de efeito estufa no Brasil (MCTI, 2014).

Os setores de agropecuária e energia foram os que mais emitiram gases de efeito estufa no ano de 2012 (37% do total). Em sequência vem o setor de florestas, representando 15% das emissões, valor bem abaixo dos 58% registrados em 2005. Processos industriais estão em 4º lugar com 7% e por último o setor de tratamento de resíduos com 4% do total das emissões. Com esses dados o Brasil está próximo de atingir as metas previstas para 2020,

estabelecidas pela Lei 12.187 de 2009, a qual define o compromisso nacional de reduzir as emissões de gases de efeito estufa (MCTI, 2014).

As questões atmosféricas e a saúde do homem estão diretamente relacionadas. A péssima qualidade do ar dos últimos anos gerou sérios problemas econômicos, ambientais e de saúde no mundo inteiro. Os poluentes na atmosfera como dióxido de enxofre, óxidos de nitrogênio, ozônio e compostos orgânicos voláteis, quando inalados penetram no sistema respiratório e causam uma série de reações biológicas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou dados alarmantes sobre a qualidade do ar e a saúde humana. O estudo indicou que 6,7% das doenças no mundo podem ser atribuídas à poluição do ar por partículas. Mais de 152.000 mortes prematuras são consequência à exposição ao ozônio. Sendo 40% por isquêmica do coração, 40% acidente vascular cerebral, 11% doença pulmonar, 6% câncer de pulmão e 3% infecções respiratórias em crianças (WMO, 2014 b).

O parecer do PNUMA (Programa das Nações Unidas para o Ambiente) em relação às metas climáticas para 2020 mostra que as ações apresentadas pelos governos, ainda estão longe do ideal e do que é preciso para mitigar as mudanças no clima. As consequências irão afetar milhões de pessoas no mundo inteiro, além de destruir ecossistemas e levar a extinção de espécies (TESKE, 2013).

Para alcançar os objetivos propostos em relação ao meio ambiente e o clima se faz necessário mudanças reais na matriz energética, e maior investimento em combustíveis renováveis, os quais são menos agressivos ao planeta (IPCC, 2014; TESKE, 2013).

3.6 Combustíveis renováveis

O desenvolvimento econômico e social da sociedade moderna depende diretamente de energia. A Revolução Industrial desencadeou o aumento desenfreado em busca de recursos e energia, tendo os combustíveis fósseis como principal fonte de desenvolvimento. A demanda por energia cresce progressivamente e a estimativa é que triplicará durante o século XXI. O uso descontrolado dos sistemas energéticos a fim de abastecer a demanda global por energia é responsável pela maioria dos problemas ambientais enfrentados na atualidade (IGBP, 2012).

A matriz energética necessita ser remodelada, sendo importante ampliar a produção e o consumo de formas renováveis e limpas de energia, através de políticas públicas, subsídios, financiamentos e investimentos. Os processos energéticos precisam ser revistos com o objetivo de diminuir consideravelmente as emissões de gases poluentes, proteger a saúde, o

solo, as águas e a biodiversidade (IGBP, 2012).

Além dos benefícios ambientais, a expansão do uso de fontes renováveis na matriz energética garante a independência internacional de combustíveis fósseis e possibilita o acesso à eletricidade para localidades remotas. A busca por energias limpas não se trata apenas de questões ambientais, mas aborda fatores sociais e econômicos cruciais para o desenvolvimento global. As fontes de energias renováveis são inúmeras e estão se tornando cada vez mais competitivas, porém se encontram em diferentes níveis de maturidade e desenvolvimento. Ainda assim, apresentam diversas vantagens em relação aos combustíveis fósseis, como a redução nos custos de exploração, menor emissão de poluentes e sistemas descentralizados de energia (TESKE, 2013; GALLINA; DIAS; RODRIGUES, 2014).

As fontes de energias renováveis são provenientes de recursos naturais e inesgotáveis, como a energia solar (sol), eólica (vento), biomassa, hídrica e geotérmica. No ano de 2013 o consumo de energia a partir de fontes renováveis aumentou 2,7%, superior a 0,8% de uma década atrás. A geração de energia por renováveis também continuou a expandir, chegando a aumentar 16,3%. A China foi o país que registrou o maior crescimento com renováveis, seguido pelos Estados Unidos. Em termos de fontes energéticas, a energia solar foi a que mais se desenvolveu (33%), a energia eólica cresceu 20,7%, enquanto os biocombustíveis aumentaram abaixo da média, sendo os maiores produtores o Brasil (16,8%) e os EUA (4,6%) (BP ESTATISTICAL, 2014).

A utilização de biocombustíveis pode caracterizar-se uma alternativa aos combustíveis fósseis, visto que são produzidos pelo aproveitamento de recursos da biomassa (plantas oleaginosas, cana-de-açúcar, resíduos florestais e industriais, entre outros). Os biocombustíveis apresentam como principais características serem biodegradáveis, renováveis, liberarem na atmosfera 98% menos enxofre e 50% menos elementos particulados que outros combustíveis de origem fóssil, além de, promoverem a geração de empregos e a expansão da agricultura familiar (DERMIBAS, 2008).

Quando provenientes de matéria prima vegetal, os biocombustíveis auxiliam no ciclo do carbono na atmosfera, uma vez que o CO₂ emitido na combustão é reabsorvido novamente, diminuindo o impacto ambiental, pois reduz as emissões de CO₂ (BENEDETTI et al., 2009).

A produção de biocombustíveis busca novas tecnologias que possibilitem inovações na área de energia. No Brasil os dois principais biocombustíveis utilizados são o biodiesel e o etanol, os quais são produzidos por meio de fontes renováveis e contribuem positivamente com a redução da poluição do meio ambiente (GODOI; OLIVEIRA Jr.; MATAI, 2012).

3.6.1 Biodiesel

O Biodiesel se caracteriza por ser um combustível biodegradável, que não contém compostos sulfurados e aromáticos, sendo derivado de fontes renováveis como óleos vegetais e gorduras animais. Quando comparado ao diesel oferece vantagens como a baixa emissão de gases poluentes, por exemplo, o dióxido de carbono. É constituído por ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos a partir de reação de transesterificação de triglicerídeos. O processo de transesterificação consiste na reação dos triglicerídeos presentes nos óleos vegetais ou gorduras animais com álcool em presença de catalisador, formando o biodiesel (MAIA et al., 2011; FOLQUENIN et al., 2011; MATOS, 2012).

No Brasil existem diferentes espécies de oleaginosas das quais se podem produzir o biodiesel, como a mamona, o dendê, o girassol, o babaçu, a soja e o algodão. Além dessas matérias primas, esse biocombustível pode ser produzido a partir de resíduos como óleos de frituras e de sebo bovino (APOLINÁRIO, 2012; GALLINA et al., 2014a).

A fim de estimular a produção de biocombustíveis, o governo brasileiro estabeleceu a lei Nº 11097/2005, a qual exigia a obrigatoriedade de 5% de biodiesel ao combustível de petróleo. No ano de 2014, a lei foi revogada, entrando em vigor a lei Nº 13.033 de 24 de setembro, a qual estabelece o percentual obrigatório de 7% de biodiesel ao óleo diesel comercializado (BRASIL, 2005; BRASIL, 2014).

Por se tratar de uma alternativa ao óleo diesel do petróleo, o biodiesel tem se mostrado protagonista na diminuição da poluição por emissão de gases do efeito estufa. Entre outras vantagens, colabora com a mudança na matriz energética, auxilia na independência do país em relação ao petróleo e ainda trás benefícios sociais como a geração de renda e empregos na agricultura familiar (MDA, 2011; VIOMAR; BANCZEK; RODRIGUES, 2013).

Desde quando o biodiesel começou a ser produzido e consumido no Brasil, se obteve avanços na qualidade do ar, principalmente nas grandes cidades. As emissões de gases do efeito estufa reduziram e foi evitada a emissão de aproximadamente 22 milhões de CO₂ na atmosfera. Dentre as matérias-primas utilizadas se destacam a soja (69,6%), o sebo bovino (14,7%) e o algodão (3,61%) (MAPA, 2014).

Segundo o Balanço Energético Nacional do ano de 2014, a quantidade de B100 produzido no Brasil no ano de 2013 alcançou 2.917.488 m³, já no ano anterior a produção era de 2.717.483 m³. Com esse valor, observou-se alta de 7,4% na proporção de biodiesel disponibilizado no mercado (EPE, 2014 a).

3.6.2 Etanol

O processo de fabricação de etanol para uso como combustível foi estimulado pelo governo Getúlio Vargas, quando surgiu a necessidade de se desenvolver um combustível que viabilizasse o processo de produção de açúcar, em relação ao preço e a oferta interna. No ano de 1933 foi criado o Instituto do Açúcar e Alcool (IAA), com a finalidade de preservar a economia do Brasil das flutuações do mercado externo. O IAA foi desfeito em 1990 e o governo parou de estipular o preço da cana, do álcool e do açúcar (MATOS, 2012).

Em 1975 foi criado o Proálcool (Programa Nacional do Alcool), o qual tinha como objetivo assegurar a demanda de etanol no processo de substituição da gasolina, expandir a oferta de matéria-prima e desenvolver a indústria sucroalcooleira. Entre os anos de 1983 a 1988, 90% dos automóveis comercializados no Brasil eram movidos a etanol. Após as quedas nos preços do petróleo em 1980, a produção de etanol reduziu, e na década de 1990 apenas 1% dos automóveis comercializados eram movidos a etanol. O etanol ainda manteve participação considerável na matriz energética brasileira, devido à adição de etanol anidro à gasolina e também pelo desenvolvimento dos carros flex (MATOS, 2012).

A produção do etanol combustível ocorre por fermentação de açúcar ou pela quebra química do amido existente em grãos como milho, trigo e centeio. No Brasil a principal matéria-prima utilizada é a cana-de-açúcar, já nos Estados Unidos o milho é a matéria-prima mais usada e na União Europeia utiliza-se normalmente o trigo. Nos veículos o etanol pode ser utilizado de forma pura ou adicionado à gasolina em proporções de 18% a 27,5% (MAIA et al, 2014; TESKE, 2013).

O etanol apresenta fórmula molecular C_2H_6O , pode ser empregado como combustível (motores ciclo Otto) misturado com a gasolina, no caso do etanol anidro, ou puro, normalmente hidratado. De acordo com a normatização brasileira o etanol anidro precisa conter menos de 0,6% de água e o etanol hidratado entre 6,2 e 7,4% (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008).

Nos dias de hoje dois fatores principais incentivam a produção de etanol, em primeiro lugar o preço de petróleo e em segundo a instabilidade econômica e política dos países produtores. Junto com esse cenário as emissões de poluentes na atmosfera e o aquecimento global estimulam a produção e o consumo do etanol, um combustível renovável e menos agressivo ao meio ambiente (SOUSA; SCUR; SOUZA, 2012).

Segundo o Balanço Energético Nacional de 2014, houve aumento de 17,6% na

produção de etanol, chegando ao valor de 27.608,6 mil m³. Do total da produção, 56,5% refere-se ao etanol hidratado (15.603,9 mil m³). O etanol anidro, o qual é misturado à gasolina, teve alta de 25,5%, registrando o valor de 12.004,7 mil m³ (EPE, 2014 a).

O mercado do etanol irá aumentar nos próximos anos, em consequência das legislações ambientais que forçam o uso de biocombustíveis nos meios de transporte, como é o caso do Protocolo de Kyoto, que prevê a mistura de biocombustíveis na gasolina e a ampliação de automóveis bicombustíveis. Os países que mais participam do mercado de etanol são Brasil e Estados Unidos, somando 80% de toda produção e comercialização mundial. (PACHECO, 2011; MME, 2014).

O etanol produzido e comercializado no Brasil é o de primeira geração, a partir da fermentação do caldo da cana-de-açúcar principalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Mesmo sendo uma tecnologia estabelecida, com baixo custo e alta produtividade, ainda existem possibilidades a serem exploradas, buscando resolver aspectos econômicos, logísticos e de produtividade. Nesse panorama o etanol de segunda geração (E2G) pode vir a auxiliar, impulsionando o mercado do etanol (SOUSA; SCUR; SOUZA, 2012).

O etanol de segunda geração pode ser produzido a partir do bagaço e da palha da cana-de-açúcar, materiais lignocelulósicos de variadas fontes e biomassa de resíduos industriais ou agrícolas. O processo se baseia na quebra da fonte celulósica ou de biomassa, que pode ser de forma química, física ou enzimática, com o objetivo de obter a sacarose para produção do etanol. Diversos países estão realizando pesquisas sobre o etanol de segunda geração a fim de torná-lo competitivo no mercado, entre estes, Brasil e Estados Unidos são os maiores incentivadores (SOUZA, 2013).

A associação entre os sistemas de primeira e segunda geração de etanol irão beneficiar a rota desse biocombustível, aumentar o volume de etanol produzido em relação à matéria-prima utilizada, reaproveitar resíduos, alavancar a economia e contribuir com o meio ambiente (PACHECO, 2011).

3.7 Resíduos industriais com potencial energético

3.7.1 Glicerol coproduto do biodiesel

Glicerol (C₃H₈O₃) é o nome de composto orgânico 1,2,3-propanotriol, que foi descoberto por Carl W. Scheele no ano de 1779, os seus sinônimos são glicerina,

trihidroxiopropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxiopropano. O glicerol pode ser encontrado naturalmente na natureza em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol) e em animais como composto termorregulador combinado com ácidos graxos. Na sua forma pura o glicerol é um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, apresenta sabor doce, solúvel em água e álcool e insolúvel em éter e clorofórmio. Quando purificado apresenta diversas aplicações nas indústrias de cosméticos, alimentos, farmacêutica e na fabricação de resinas (YANG et al., 2013).

O glicerol bruto é o principal coproduto da produção do biodiesel, representando aproximadamente 10% do total da produção. O glicerol residual do biodiesel obtido por processo de transesterificação contém diversos contaminantes como ácidos graxos, catalisadores, sais e água. O custo de purificação se torna dispendioso e pesquisas estão sendo direcionadas buscando a utilização do glicerol bruto diretamente, sem a necessidade de pré-tratamento. Visando dessa forma, viabilizar a rota do biodiesel, dar um destino adequado a esse resíduo, agregar valor econômico e ainda proteger o meio ambiente evitando o descarte irregular em locais inapropriados (AYOUB; ABDULLAH, 2012; SILVA et. al., 2009).

Na Figura 4 é apresentada a reação global de transesterificação, principal rota para obtenção do biodiesel e geração do coproduto, o glicerol.

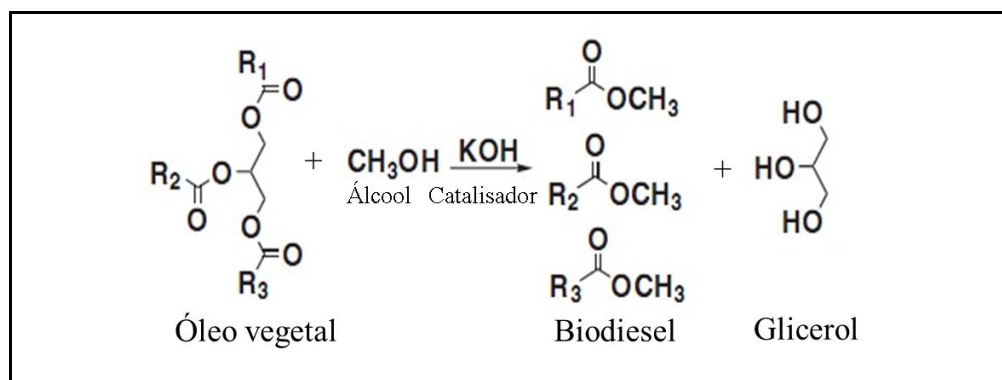


Figura 4. Transesterificação de óleos vegetais (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

A primeira etapa consiste na conversão de triglicerídeos em diglicerídeos, posteriormente a conversão destes em monoglicerídeos, e por último os glicerídeos são convertidos a glicerol, o que rende uma molécula de éster de álcool por glicerídeo em cada etapa. No final do processo de transesterificação, se forma uma massa líquida de duas fases facilmente separadas por decantação, na qual a fase superior contém os ésteres metílicos ou

etílicos que formam o biodiesel, e a fase inferior é composta por glicerol bruto e impurezas (RIVALDI et al., 2008; TAN; AZIZ; AROUA, 2013).

Na Tabela 1 podem ser observadas as propriedades físico-químicas do glicerol.

Tabela 1. Propriedades do glicerol (HAYNES, 2012).

Propriedades	Valores
Massa molar	92,09 g/mol
Densidade (glicerol 100%) 25°C	1260 kg/m ³
Viscosidade 20°C	939 cP
Ponto de ebulição (1 atm)	290°C
Ponto de fusão	18°C
Ponto de inflamação	177°C
Tensão superficial 20°C	63,4 mN/m
Calor específico (glicerol 99,94%) 26°C	2435 J/kg
Calor de evaporação 55°C	88,12 J/mol
Calor de dissolução	5,8 kJ/mol
Calor de formação	667,8 kJ/mol
Condutividade térmica	0,28 W/(m.K)

As características do glicerol residual dependem do tipo de ácido graxo utilizado na produção do biodiesel, como também do tipo de catalisador empregado no processo. Alternativas para o emprego do glicerol vêm sendo estudadas, uma delas é a plastificação do amido para produção de plástico biodegradável, também é usado para substituir o etilenoglicol em produtos anticongelantes. Pode ser aplicado em processos eletroquímicos para produção de hidrogênio. E ainda, por ser uma excelente fonte de carbono, pode ser aproveitado por microrganismos para realizar fermentação anaeróbica e converte-lo em produtos de maior valor econômico (COFRÉ et al., 2011; GALLINA et al., 2014b).

Por se tratar de um composto fundamental no metabolismo dos microrganismos, exercendo função de precursor para variados compostos e regulador intracelular, o emprego do glicerol em processos microbiológicos é de grande interesse. O glicerol é composto por nutrientes como enxofre, magnésio, fósforo, cálcio, sódio e nitrogênio, os quais podem auxiliar no crescimento dos microrganismos durante a fermentação (ITO et al., 2005).

A utilização do glicerol em processos de fermentação comparado a outros que utilizam açúcares comuns, oferece melhores respostas de rendimento por possuir redução nos átomos de carbono. Podendo ser utilizado como substituto para substratos tradicionais como sacarose, glicose e amido, utilizados em processos fermentativos. Se comparado com a glicose, a

conversão do glicerol em fosfoenolpiruvato gera o dobro de equivalentes redutores, representando um rendimento global duas vezes maior o da fermentação da glicose (GONZALEZ et al., 2008; DHARMADI; MURARKA; GONZALEZ, 2006).

O glicerol quando fermentado por bactérias anaeróbicas facultativas pode ser convertido a vários produtos de maior valor econômico, como o 1,3-PD (monômero aplicado na geração de biopolímeros), 2,3 butanodiol, biogás, ácido acético, ácido lático e etanol (SAXENA et al., 2009; KOVALSKI et al., 2013).

A bactéria *Escherichia coli* é um dos microrganismos capazes de produzir álcool através da fermentação do glicerol por conversão microbiológica. Condições adequadas como ausência de oxigênio, pressão, temperatura e pH ideal, são essenciais para a atividade metabólica da bactéria e o processo microbiológico para produção de metabólitos como o etanol (LIMA et al., 2007; COFRÉ et al., 2011).

Na Figura 5 encontra-se a rota metabólica da degradação do glicerol e formação dos possíveis produtos finais, por processo de fermentação a partir de diferentes microrganismos, incluindo a bactéria *Escherichia coli*.

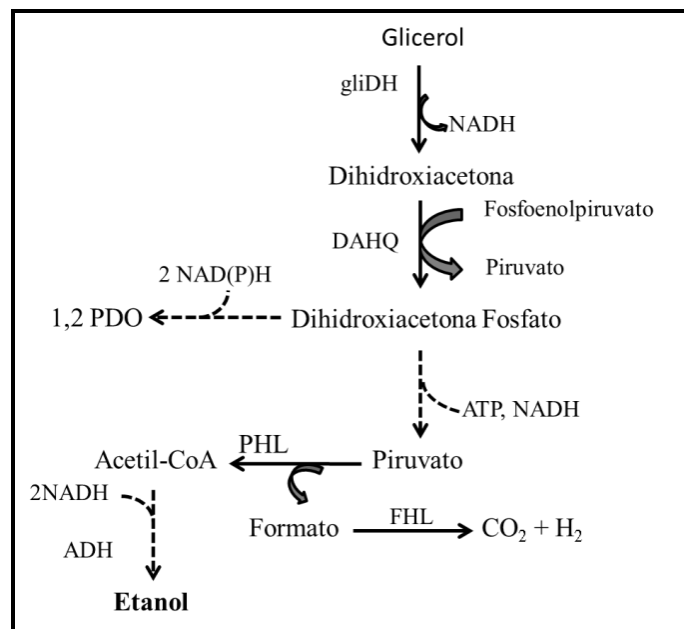


Figura 5. Rota metabólica da degradação de glicerol por *Escherichia coli* (GONZALEZ, et al., 2008; DURNIN et al., 2008; SILVA et al., 2009; ADNAN et al., 2014).

A conversão do glicerol em produtos de maior valor econômico a partir de rotas metabólicas é uma forma interessante e vantajosa de aproveitar o excesso desse resíduo na

indústria do biodiesel. O maior desafio atualmente é desenvolver processos e serviços em que o glicerol deixe de representar um gargalo na produção do biodiesel, para que esse biocombustível possa oferecer maior rentabilidade econômica e menos problemas ambientais (RIVALDI et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2011; ADNAN et al., 2014).

Mota, Silva e Gonçalves (2009) estudaram novos produtos e processos a partir do glicerol residual da produção do biodiesel. Os autores discutiram a transformação química do glicerol em outros compostos de maior valor agregado, tais como éteres, acetais, ésteres de aplicações tecnológicas, e aplicações no setor de combustíveis.

Cofré et al. (2011) realizaram uma pesquisa com o aproveitamento do glicerol para produção de etanol utilizando a bactéria *Escherichia coli*. Os autores buscaram aperfeiçoar meios de cultura por um projeto de triagem utilizando o programa Plackett-Burman, a fim de obter as melhores condições de fermentação. Foi utilizado glicerol com 99% de pureza, junto com um mix de tampão fosfato, cloreto de amônio, fosfato monopotássico, sulfato de sódio, cloreto de sódio e sulfato de magnésio.

Varrone (2013) descreveu um processo de fermentação do glicerol para produção de etanol e hidrogênio. No referido processo é utilizado um consórcio de bactérias derivadas de lodo ativado de processos de fermentação, esgoto vegetal ou sedimentos de lagoas eutrofizadas. O glicerol é diluído em meio de cultura e inoculado ao consórcio de bactérias, fermentado em condições anaeróbicas a 37-38 °C.

Caparica et al. (2013) desenvolveram um processo de obtenção de etanol por fermentação microbiológica do glicerol bruto utilizando a bactéria *Escherichia coli*. No método desenvolvido são utilizados diferentes meios de cultura com a finalidade de estimular a fermentação bacteriana. Foram empregados os meios de cultura triptose, peptona, lactose e dextrose.

Suhaimi et al. (2012) avaliaram a bioconversão do glicerol em etanol a partir de diferentes microrganismos e comparou a eficiência da fermentação das linhagens selecionadas. O melhor rendimento observado foi com a cepa de *Escherichia coli* SS1 e, além disso, foi o microrganismo que mostrou maior afinidade com o glicerol para produção de etanol.

Além do glicerol residual do biodiesel, outros resíduos industriais podem ser empregados em processos de fermentação. A indústria de papel e celulose produz elevada quantidade de resíduos, e estes possuem potencial energético, podendo ser utilizados em processos de conversão para produção de energia (SÁNCHEZ; KAFAROV, 2011).

3.7.2 *Resíduos lignocelulósicos*

O Brasil se destaca por ser um dos grandes produtores mundiais de papel e celulose no mundo. Segundo dados da BRACELPA (Associação Brasileira de Celulose e Papel), o país é o 4º maior produtor de celulose gerando 13.977 mil toneladas de celulose e o 9º maior produtor de papel, produzindo de 10.260 mil toneladas de papel por ano. No Brasil atuam 220 empresas em 18 estados, existem 2,2 milhões de hectares de florestas plantadas para fins industriais e 2,9 milhões de hectares de florestas preservadas, oferecem 128 mil empregos diretos e 640 mil empregos indiretos (BRACELPA, 2014).

O potencial brasileiro nesse setor é destaque por apresentar mão de obra qualificada, clima e solo adequado e investimentos em pesquisas de genética e biotecnologia. As florestas plantadas auxiliam na restauração de terras degradadas, não competem com agricultura tradicional e contribuem com o sequestro de CO₂. De acordo com a BRACELPA, anualmente são absorvidos 1 bilhão de toneladas de CO₂ da atmosfera pelas florestas plantadas, colaborando diretamente com a preservação do meio ambiente (MAIOLINO, 2013).

As indústrias madeireiras, assim como de papel e celulose, envolvem basicamente o processamento físico, químico e mecânico da madeira, e no final do processo de produção, gera-se uma série de resíduos. Uma indústria de papel, por exemplo, gera aproximadamente 10 toneladas de rejeitos por dia. Como essa cadeia produtiva funciona em larga escala, a aplicação de novos processos de aproveitamento destes resíduos é considerada um desafio contínuo para as indústrias. A grande demanda de madeira no mundo, e seu papel fundamental na economia fazem deste recurso um importante foco de pesquisas e estudos (WIECHETECK, 2009; FERREIRA, 2013).

Durante o processo de produção os resíduos gerados são galhos, topos, e cascas, os quais na maioria das vezes são deixados no campo para adubação. Após a classificação cascas e cavacos são descartados e normalmente encaminhados para queima. No processo de produção de celulose é gerado o licor preto, o qual pode ser queimado em caldeiras de recuperação. Para produção de papel são gerados sobras de aparas, coque, fibras e fiapos. Mesmo com todo esforço para reaproveitamento desses resíduos, grande parte ainda é destinada a aterros sanitários e depósitos inadequados (BRACELPA, 2010).

A produção elevada de resíduos e o baixo reaproveitamento geram passivos ambientais e danos econômicos para a indústria, sociedade e governo. Contudo, parte desses resíduos apresenta potencial energético, podendo ser utilizados como matéria-prima em

processos de combustão direta, gaseificação, briquetagem e pirólise. Resíduos da indústria de papel e celulose apresentam também em sua composição, grande quantidade de celulose podendo ser empregados em bioprocessos (WIECHETECK, 2009; QUIRINO et al., 2012; OJEDA; SÁNCHEZ; KAFAROV, 2011).

De acordo com o Cenbio (Centro Nacional de Referência em Biomassa), a geração de energia a partir da biomassa pode ser classificada em duas categorias. A primeira é a tradicional, obtida por combustão direta da lenha, madeira, resíduos de animais e urbanos. A outra categoria é a moderna, na qual a energia é gerada por tecnologias avançadas de conversão (VIDAL; HORA, 2011).

A Figura 6 apresenta as diferentes rotas de conversão para produção de energia, que podem ser empregados os resíduos de biomassa da indústria de papel e celulose e resíduos florestais.

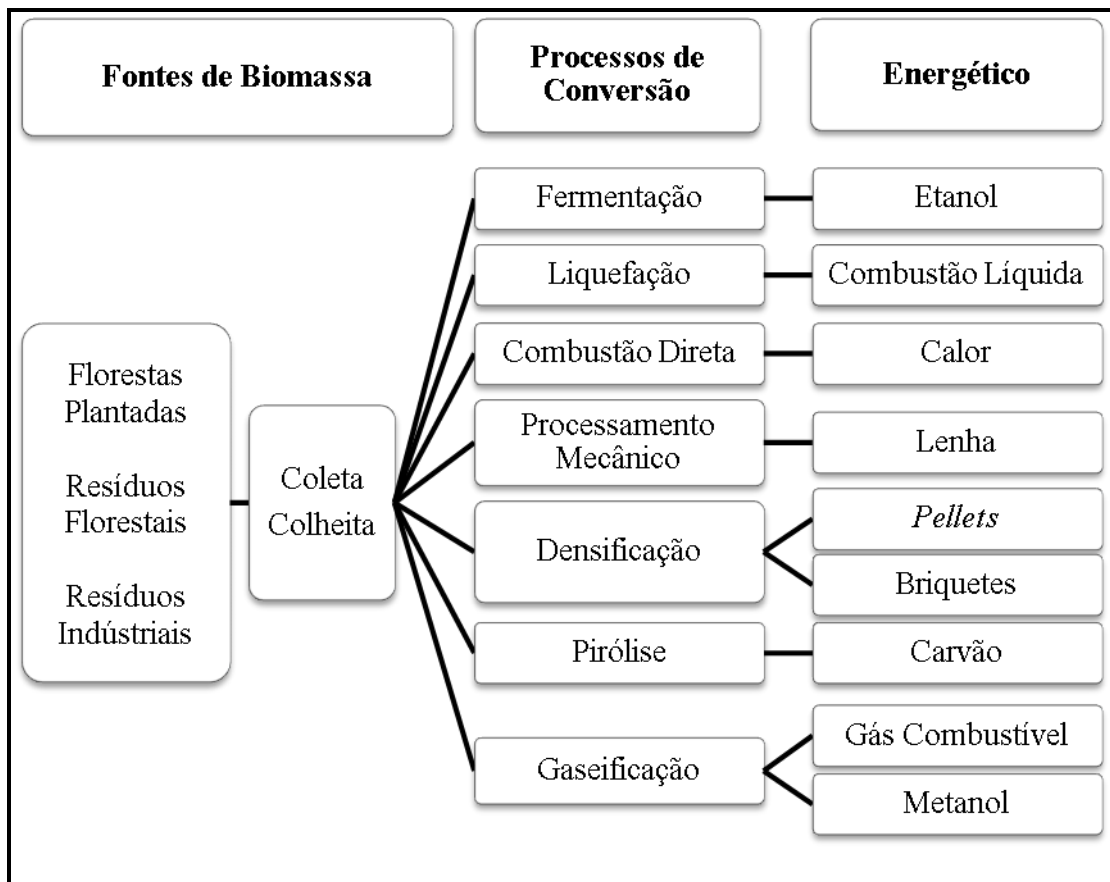


Figura 6. Rotas de aproveitamento da biomassa (VIDAL; HORA, 2011).

Os diversos processos de conversão são comparados em relação à eficiência energética, custo e emissões de gases poluentes. A valorização dos diferentes sistemas

depende da infraestrutura exigida e das condições do mercado no momento. A utilização de biomassa florestal como fonte de energia vem crescendo e sendo estimulada, se caracterizando como um destino adequado a grande demanda de resíduos produzidos no setor (VIDAL; HORA, 2011; AKHTARI; SOWLATI; DAY, 2014).

A composição química da madeira pode ser bastante variada, dependendo da espécie. É constituída basicamente por celulose, hemicelulose, lignina e pequenas quantidades de extrativos e sais minerais. A celulose é o principal componente da madeira, constitui cerca de 40%, se caracterizando como um polímero linear, formado por moléculas de anidro-glicose unidas através de ligações β -(1-4)-glicosídicas. A hemicelulose é composta por glicose, manose, galactose, xilose, arabinose, e pode ainda apresentar diferentes quantidades de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira. A hemicelulose compõe aproximadamente 20% da madeira e apresenta-se na forma de polímeros ramificados de menor massa molar que a celulose, podendo ser homopolímeros ou heteropolímeros. Por sua vez, a lignina é constituída de unidades de fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa, representa cerca de 20% do total da madeira (TAIZ; ZEIGER, 2013; KERBAUY, 2012).

As propriedades físicas dos resíduos da indústria de papel e celulose são fundamentais para o emprego como fonte energética. Os parâmetros mais importantes para biomassa são a umidade residual e a densidade energética. A baixa densidade resulta em altos custos de transporte e armazenamento. A umidade tem relação com o poder calorífico, quanto maior umidade, menor é o poder calorífico. Outros parâmetros que devem ser considerados são a percentagem de material volátil, carbono fixo e teor de cinzas (VIDAL; HORA, 2011; ACHARJEE; CORONELLA; VASQUEZ, 2011).

A geração de energia proveniente de resíduos da matriz lignocelulósica se mostra como uma alternativa interessante, mundialmente estudada, com foco na conversão dos resíduos em produtos de maior valor agregado. A utilização desses rejeitos como fonte de energia apresenta diversas vantagens como o baixo custo para aquisição da matéria-prima, redução das emissões, preservação da biodiversidade, além de ser um recurso renovável. No entanto, ainda se faz necessário maior incentivo de infraestrutura, subsídios econômicos e desenvolvimento de tecnologia avançada para viabilizar a rota de reaproveitamento de resíduos lignocelulósicos, como fonte de matéria-prima para geração de energia (LIMAYEM; RICKE, 2012; ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; MABEE; MCFARLANE; SADDLER, 2011).

Silva F. V. (2012) fez uma abordagem sobre o panorama e as perspectivas do etanol lignocelulósico no Brasil. Na pesquisa foram explorados os caminhos atuais mais promissores para a produção do etanol a partir de materiais lignocelulósicos, como resíduos agrícolas, industriais e florestais. O estudo demonstrou que o Brasil tem incentivado o desenvolvimento de técnicas de produção mais eficientes, no entanto, ainda se fazem necessárias mais pesquisas na área para tornar o etanol lignocelulósico viável economicamente.

Jiang et al. (2013) estudou a fermentação de materiais celulósicos para produção de bioetanol a partir de populações bacterianas. A fermentação foi realizada em batelada, empregando-se culturas de *Clostridium thermocellum* e *Thermoanaerobacter pseudethanolicu*, em um fermentador semi-contínuo por 96 h. O estudo demonstrou ser possível produzir bioetanol celulósico por fermentação microbiológica, sendo a concentração de substrato e o pH, parâmetros importantes para conversão da celulose.

Saha e Cotta (2012) pesquisaram a capacidade da bactéria *Escherichia coli* recombinante FBR5 de produzir etanol a partir de hexoses e pentoses derivadas da biomassa lignocelulósica. O estudo demonstrou que em condições adequadas a bactéria é capaz de fermentar os açúcares e é tolerante aos inibidores da fermentação como o furfural e ácido acético, apresentando potencial para ser utilizada em processos industriais.

Gomes e colaboradores (2008) desenvolveram um processo de aproveitamento de resíduos lignocelulósicos e sua aplicação na produção de etanol. O processo baseia-se na produção de enzimas a partir do fungo *Penicillium funiculosum* adaptado em meio de cultivo com substrato celulósico. O processo de fermentação a partir do fungo resulta em um preparado enzimático capaz de hidrolisar a celulose e a hemicelulose para a produção de etanol.

3.8 Biotecnologia

A biotecnologia consiste em uma ferramenta indispensável para o desenvolvimento de novas tecnologias nos mais variados setores. Pode ser definida como um agregado de técnicas que fazem uso de sistemas biológicos ou organismos vivos para a produção ou modificação de produtos e processos (MAPA, 2010).

Pode-se dividir a biotecnologia em duas vertentes, a clássica e a moderna. A clássica está relacionada às atividades milenares que o homem desenvolve, como a fermentação e produção de pão e vinho. A moderna diz respeito a processos mais complexos como a

engenharia genética, DNA recombinante e cultura de células e embriões. O termo biotecnologia é bastante novo, sendo utilizado pela primeira vez no início do século passado, porém, o princípio do qual se originou é muito antigo (EMBRAPA, 2011).

Esse ramo de estudo envolve uma complexa gama de conhecimentos provenientes da ciência e da tecnologia. Abrange desde a ciência básica (microbiologia, biologia molecular e celular), como a ciência aplicada (imunologia, bioquímica, física e eletrônica) e também outras técnicas diversas (purificação, fermentação, informática, robótica e processos). Os avanços gerados com a biotecnologia são numerosos, como plantas modificadas e mais resistentes ao ataque de pragas, medicamentos, vacinas, detergentes, biodegradação, processos industriais menos poluentes, biocidas, biocombustíveis, trazendo benefícios econômicos, sociais e ambientais (MALAJOVICH, 2011).

A primeira revolução biotecnológica ocorreu na medicina com a descoberta da utilidade dos microrganismos para a produção de vacinas, tendo Louis Pasteur como pioneiro. O cientista Gregor Mendel também contribuiu diretamente com o desenvolvimento da biotecnologia, sendo considerado o pai da genética. Entre outros importantes cientistas James Watson e Francis Crick marcaram o início de uma nova era na ciência, com a elucidação da estrutura do DNA. A partir deste momento os avanços na biotecnologia não pararam de progredir e possuem aplicações ligadas ao ambiente, a indústria, saúde, agropecuária e pesquisa (EMBRAPA, 2011)

Os microrganismos vêm sendo aplicados na produção de vacinas, alimentos, antibióticos e vitaminas há muitos anos. Atualmente os mesmos são utilizados para geração de compostos químicos e outras substâncias que não podem ser produzidas de forma natural, a partir de engenharia genética ou outros processos como fermentação. Entre os microrganismos mais utilizados em processos de fermentação estão as bactérias (*Bacillus*, *Zymomonas*, *Acetobacter*, *Escherichia coli*, etc.), os fungos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, etc.) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; EMBRAPA, 2011; TRABULSI, 1998).

A fermentação pode ser definida como um processo que libera energia a partir de açúcares ou outras moléculas orgânicas. Não necessita de oxigênio, mas pode ocorrer na presença do mesmo. Não necessita da utilização do ciclo de Krebs e utiliza uma molécula orgânica como aceptor final de elétrons. Produz pequena quantidade de ATP, pois a maior parte da energia inicial permanece nas ligações químicas dos produtos finais. Os tipos mais importantes de fermentação são do ácido lático e a fermentação alcoólica. A fermentação do

ácido láctico pode ocasionar a deterioração de alimentos, mas também pode vir a produzir o iogurte proveniente do leite, chucrute do repolho e conservas de pepino. A fermentação alcoólica leva a produção de álcool das bebidas alcoólicas, etanol combustível e dióxido de carbono responsável pelo crescimento de pães (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Na Tabela 2 encontram-se os principais microrganismos envolvidos em processos de fermentação e os metabólitos finais resultantes (NEIDHARDT; INGRAHAM; SCHAECHTER, 1990; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Tabela 2. Produtos finais de fermentações microbianas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Organismo	Produtos finais da fermentação
<i>Streptococcus, Lactobacillus, Bacillus</i>	Ácido láctico
<i>Saccharomyces</i> (levedura)	Etanol e CO ₂
<i>Propionibacterium</i>	Ácido propiônico, ácido acético, CO ₂ e H ₂
<i>Clostridium</i>	Ácido butírico, butanol, acetona, álcool isopropílico e CO ₂
<i>Escherichia, Salmonella</i>	Etanol, ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, CO ₂ e H ₂
<i>Enterobacter</i>	Etanol, ácido láctico, ácido fórmico, butanediol, acetoína, CO ₂ e H ₂

Os produtos finais da fermentação dependem do tipo de microrganismo, do substrato utilizado na fermentação e das enzimas envolvidas no processo. Os mais importantes gêneros de bactérias de fermentação do ácido láctico são os *Streptococcus* e os *Lactobacillus*, como produzem somente ácido láctico são conhecidos como homoláticos. Já a fermentação alcoólica é feita por várias bactérias e leveduras. Os microrganismos capazes de produzir ácido láctico junto com outros ácidos ou álcoois são denominados heteroláticos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; TRABULSI, 1998).

Entre os microrganismos que apresentam potencial para ser empregados em processos biotecnológicos a bactéria *Escherichia coli* é de grande interesse, pela sua versatilidade e fácil adaptação a diversos substratos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; DAVIS et al., 1973).

3.9 Bactéria *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* foi descrita por Theodor Escherich em 1885. Compõe o grupo dos microrganismos procariotas, pertence à família das Enterobacteriaceae, são

unicelulares e se reproduzem de forma assexuada. A *Escherichia coli* habita normalmente o intestino de mamíferos, inclusive o humano, mas também é encontrada no ambiente. É uma bactéria facultativa, ou seja, pode viver com ou sem oxigênio. Caracteriza-se pela rápida adaptação a mudanças no ambiente, reproduzindo-se rapidamente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

3.9.1 Características fisiológicas da *E. coli*

O tamanho da bactéria *Escherichia coli* é de 0,5 μm de diâmetro e 1,5 μm de comprimento e apresenta forma de bacilos. Possuem citoplasmas, ribossomos, membrana plástica e um nucleóide. Não dispõe de organelas envolvidas por membrana. A composição das células é de aproximadamente 20% de oxigênio, 50% de carbono, 14% de azoto, 8% de hidrogênio, 3% de fósforo, 2% de potássio, 1% de enxofre, 0,05% de magnésio, cálcio e cloro, 0,2% de ferro e 0,3% de minerais (NEIDHARDT; INGRAHAM; SCHAECHTER, 1990; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; HOWLAND, 1968).

Na Figura 7 é apresentado um esquema da célula de *E. coli* e uma micrografia obtida por MEV.

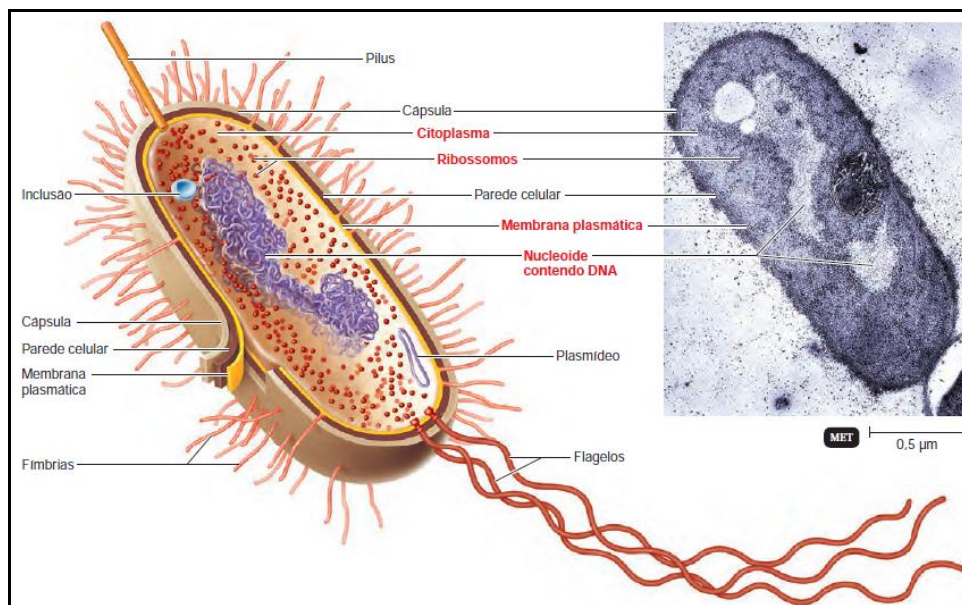


Figura 7. Estrutura de uma célula procariótica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, a qual é revestida pela membrana citoplasmática, uma membrana exterior e uma fina parede de mureína. A membrana

citoplasmática é responsável pelas transferências entre a célula e o meio ambiente. As bactérias Gram-negativas apresentam entre a membrana exterior e a membrana citoplasmática, o periplasma, uma parede composta por peptidoglicano ou mureína, que agrega à célula estrutura em condições externas. Normalmente a bactéria *Escherichia coli* apresenta dois tipos de apêndices superficiais, designados flagella e pili. Os flagella são destinados à locomoção, já os pili a adesão e reprodução. O material genético fica localizado na região central, constituído por uma molécula de ADN circular (NEIDHARDT; INGRAHAM; SCHAECHTER, 1990; DAVIS et al., 1973; TRABULSI, 1998).

É uma bactéria mesófila, pode crescer em temperaturas de 8 a 48 °C, no entanto, a faixa normal de temperatura fica entre 21 a 37 °C, sendo a temperatura ótima para o crescimento entre 36 °C e 37 °C. O ambiente para crescimento é ideal em pH entre 6 e 8, porém, pode crescer em ritmo mais lento em pH próximo desses valores. O crescimento bacteriano depende de uma fonte de energia, que disponha de elementos como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (PELCZAR Jr.; CHAN; KRIEG, 1996).

Na Tabela 3 é apresentado o meio de cultura quimicamente definido para o crescimento de *Escherichia coli*.

Tabela 3. Meio de cultura para *Escherichia coli* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Componentes	Quantidades
Glicose	5,0 g
Fosfato de amônio, monobásico (NH ₄ H ₂ FO ₄)	1,0 g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,0 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0,2 g
Fosfato de potássio, dibásico (K ₂ HPO ₄)	1,0 g
Água	1 litro

A bactéria *Escherichia coli* é a mais utilizada por pesquisadores e microbiologistas para o emprego em experimentos, são amplamente estudadas, de fácil adaptação e se desenvolvem em diferentes sistemas, caracterizando-se como uma importante ferramenta de estudo (WILLEY; SHERWOOD; WOOLVERTON, 2008).

3.9.2 Características bioquímicas da *E. coli*

A bactéria *Escherichia coli* é capaz de fermentar de forma eficiente grande variedade de açúcares constituintes da biomassa. Apresenta capacidade de crescer em diferentes

substratos na presença ou ausência de oxigênio, sendo potencialmente interessante para ser utilizado em processos industriais por ser amplamente estudada, tanto do ponto de vista fisiológico como genético (HUFFER et al., 2012; LIU et al., 2013; CHEN et al., 2013; CAPARICA et al., 2013).

O desenvolvimento da *E. coli* é assegurado a partir da oxidação de nutrientes por uma série de reações bioquímicas. O princípio de conversão microbiológica de substratos em energia consiste no transporte da fonte de carbono para a célula e sua degradação a moléculas mais simples e posteriormente ocorre a incorporação nas vias metabólicas centrais. Durante os processos bioquímicos acontece a reparação de proteínas e polinucleótidos e a manutenção da infraestrutura da célula (HU; WOOD, 2010; KANG et al., 2009).

Na Figura 8 são representadas as principais reações envolvidas na fermentação da glucose pela bactéria *Escherichia coli*.

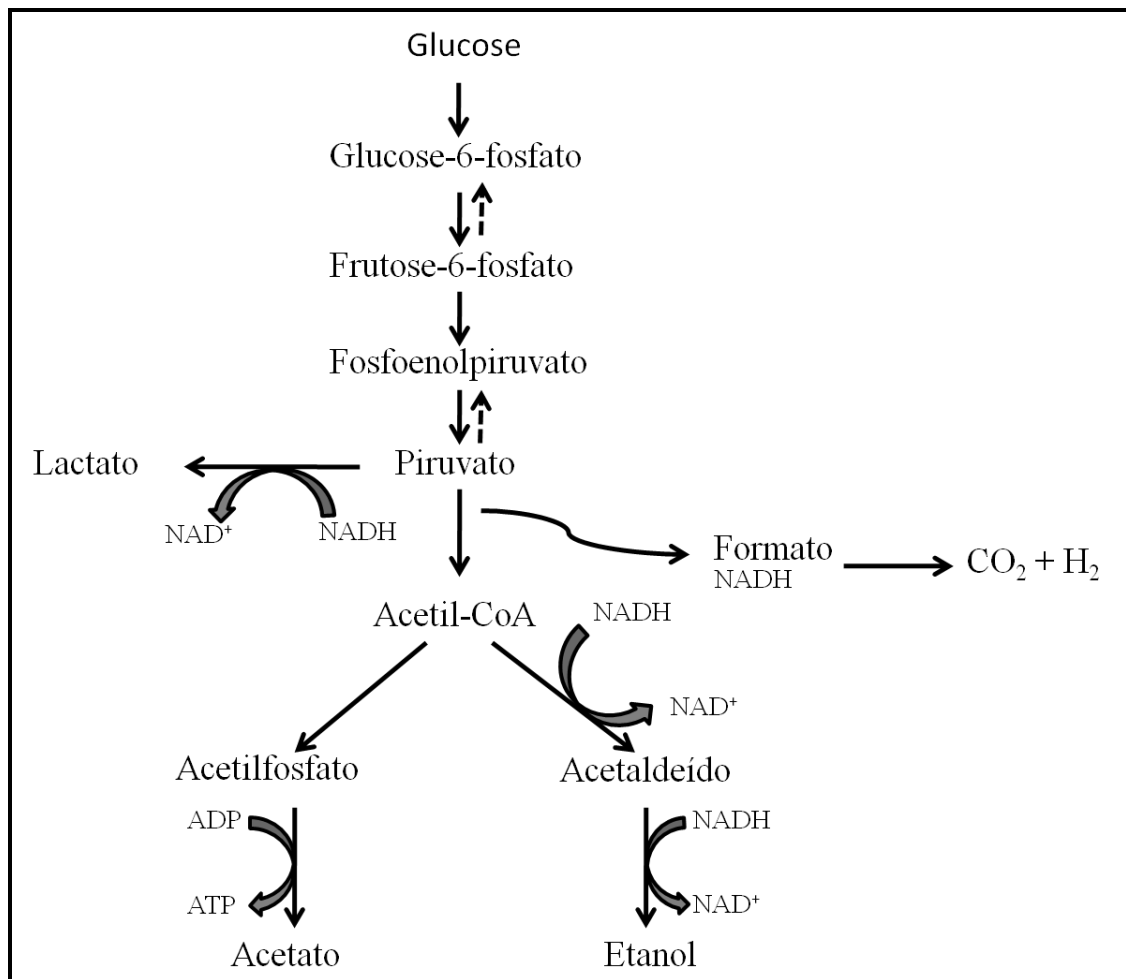


Figura 8. Vias metabólicas da fermentação por *E. coli* (MARTÍNEZ; BENNETT; SAN, 2010; DHARMADI; MURARKA; GONZALEZ, 2006; KIM et al., 2009).

Aproximadamente trinta compostos estão envolvidos no processo bioquímico da bactéria *Escherichia coli*, sendo ácidos fosforilados ou carboxílicos e tiol-ésteres da coenzima. A reação de catalise dos compostos intermediários é feita por enzimas organizadas em diferentes vias metabólicas como a glicólise (Embden-Meyerhof-Parnas), pentoses fosfato, ciclo de Krebs, *Entner-Doudorof* e fosfoceololase. Por essas vias são conduzidas a energia, em forma de ATP e NADH, e moléculas de baixo peso molecular como açúcares e aminoácidos (HU; WOOD, 2010; MARTÍNEZ; BENNETT; SAN, 2010).

Existem essencialmente quatro vias metabólicas consideradas principais no metabolismo da bactéria *Escherichia coli*, para converter carbono e oxigênio em novas células e energia sob qualquer nível de oxigênio. Quando na ausência de oxigênio ocorre o crescimento fermentativo ou fermentação da glucose com produção de etanol, acetato, formato, succinato e lactato. A via anaeróbia mais eficiente produz três moléculas de ATP, uma de acetato, uma de etanol e duas de formato por molécula de glucose fermentada. Obtendo no processo rendimento energético de aproximadamente 0,5 mol de ATP por mol de carbono (ZHAO; SHIMIZU, 2003; CARLSON; SRIENC, 2004; WOODRUFF; NANETTER; RYANT, 2013).

Sivagurunathan, Kumar e Lin (2014) investigaram a produção de hidrogênio e etanol a partir da fermentação de várias fontes de carbono com a bactéria *Escherichia coli* XL1-Blue. A fermentação foi realizada à temperatura de 35 °C em pH inicial de 6,5 e as cepas de *E coli* XL1-Blue foram imobilizadas em esferas de alginato de cálcio. As fontes de carbono empregadas foram frutose, xilose, glicose e resíduos do efluente de uma indústria de bebidas com alto teor de açúcar. O estudo demonstrou que a concentração de biomassa inicial influencia diretamente na produção de hidrogênio. A cepa estudada foi capaz de fermentar todas as fontes de carbono utilizadas de forma eficaz, sendo definida como eficiente produtora de hidrogênio e etanol.

Avcı et al. (2013) estudaram a aplicação da bactéria *Escherichia coli* FBR5 para produção de etanol pela fermentação de palha de milho. Foi utilizada uma técnica de pré-tratamento com ácido sulfúrico para diluir a palha de milho e diminuir a geração de substâncias inibidoras. A palha de milho foi submetida à hidrólise enzimática e inoculada com a bactéria *Escherichia coli* FBR5 em biorreator a temperatura de 35 °C por 24 h. O estudo demonstrou que a bactéria *Escherichia coli* FBR5 é interessante na produção de etanol a partir da palha de milho pré-tratada, com rápida fermentação e alto rendimento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

O desenvolvimento do projeto foi realizado nos laboratórios: microbiologia de águas; laboratório de combustíveis - NOVATEC/UNICENTRO; laboratório de eletroquímica - GPEL[®]/UNICENTRO; Centro de Pesquisas Avançadas Ambientais Bioenergéticas e Biotecnológicas - AMBIOTEC/UNICENTRO.

4.2 Cultivo da bactéria *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* utilizada foi a com padrão ATCC 25922, desidratada por processo de liofilização, e armazenada a temperatura de -20° C, para manter a estabilidade genética e garantir a ausência de contaminação.

As cepas de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido específico para o seu crescimento, contendo peptona, lactose, bile bovina, cloreto de sódio, fosfato de potássio dibásico e fosfato de potássio monobásico. Posteriormente foram incubadas em estufa bacteriológica, a temperatura de 36°C, em pH neutro.

4.2.1 Determinação de UFC (*Unidades formadoras de colônia*)

A análise de UFC foi realizada pela técnica de plaqueamento e diluição em série, a qual permite determinar o número de células capazes de se multiplicarem em meios de cultivos. O ensaio foi realizado pipetando-se 1 mL da amostra, e transferiu-se para um tubo de ensaio com 9 mL de solução salina obtendo uma diluição de 1:10. Após homogeneizar a amostra no tubo de ensaio, pipetou-se 1 mL da amostra e pipetou-se em um novo tubo de ensaio contendo solução salina, alcançando uma diluição de 1:100. E assim, sucessivamente até alcançar uma diluição de 1:100.000. Posteriormente pipetou-se 1 mL das amostras dos tubos de ensaios e transferiu-se para placas de Petri em meio Ágar (CECCATO-ANTONINI, 2010).

O cálculo para determinação de UFC foi realizado a partir da Equação (1):

$$\text{UFC} = \text{número de colônias na placa} \times \text{diluição} \quad (\text{Equação 1})$$

Na Figura 9 encontra-se a demonstração da técnica de plaqueamento e diluição em série.

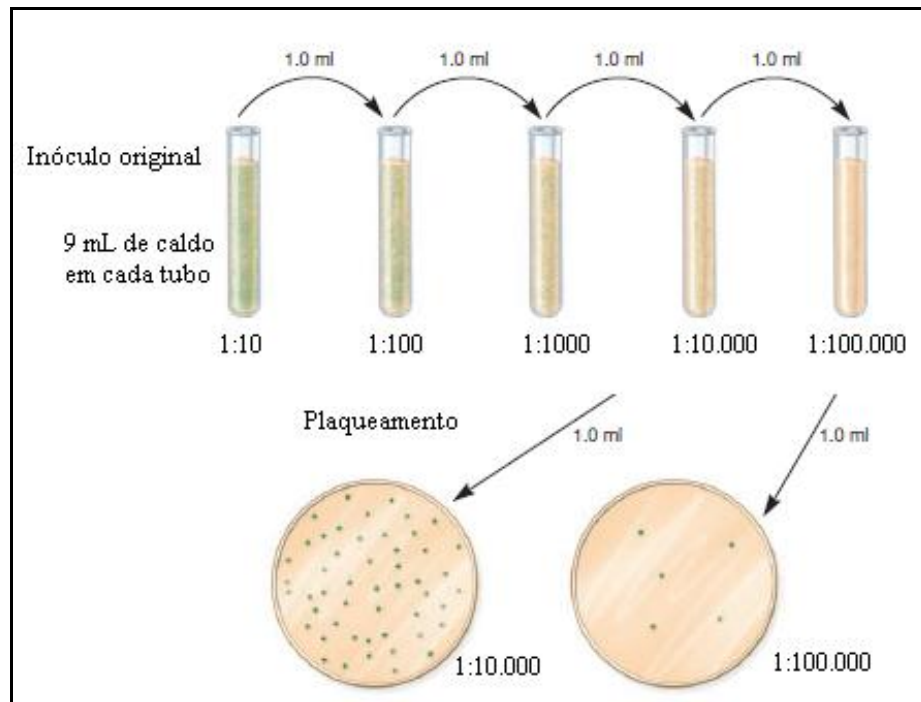


Figura 9. Técnica de plaqueamento e diluição em série (WILLEY; SHERWOOD; WOOLVERTON, 2008).

As placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica a 36 °C por 48 h e posteriormente realizou-se a leitura, obtendo-se o valor de 130×10^7 UFC para a amostra inicial de *Escherichia coli* utilizado no projeto.

O número total de células por mL no inóculo base foi realizado pelo método de contagem em câmara de Neubauer, tendo como resultado o valor de $1,49 \times 10^{17}$ células/mL (CECCATO-ANTONINI, 2010).

4.3 Obtenção da matéria prima

O glicerol utilizado foi fornecido da produção da Usina de Biodiesel da UNICENTRO, o qual contém vários elementos nutricionais, como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio (GONZALEZ et al., 2008).

Os resíduos lignocelulósicos foram cedidos por uma fábrica de papel cartão situada na região central do estado do Paraná/BR. A fibra lignocelulósica empregada no estudo foi

removida da estação de tratamento de efluentes do processo de produção do papel, sendo 50% por processo Kraft e 50% mecânico, composta de aproximadamente 80 a 90% de fibra celulósica (FERREIRA, 2013).

4.4 Preparo do glicerol

O glicerol utilizado para fermentação foi esterilizado em autoclave para garantir a ausência de contaminação por outros microrganismos e filtrado para eliminar possíveis materiais particulados.

4.5 Caracterização do glicerol

4.5.1 Análise físico-química

Para caracterização do glicerol realizou análises físico-químicas de pH, condutividade, densidade, cor e aspecto visual.

As análises de pH e condutividade foram realizadas por um pHmetro CONSORT C535. A análise de densidade foi determinada por um equipamento Infravermelho ERASPEC SN:ES 1135230. As análises de cor e aspecto foram feitas de forma visual, sendo o glicerol depositado em uma proveta e verificando-se a coloração e a presença de impurezas.

4.6 Preparo da Fibra lignocelulósica

As fibras passaram por processo térmico em estufa de secagem a temperatura de 120 °C pelo período de 48 h, posteriormente foram processadas em um moinho de facas para fragmentação em pequenas partículas.

4.7 Caracterização da Fibra lignocelulósica

4.7.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)

Para analisar a fibra lignocelulósica foi utilizada a técnica de Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR). Consiste em uma metodologia simples, rápida e não destrutiva. Não é necessária preparação prévia da amostra, nem o emprego de reagentes. É baseada na

medida do comprimento de onda e intensidade de absorção de luz infravermelha pela amostra. Foi realizada por um equipamento Bomem MB100 com faixa de operação entre 350 a 4000 cm^{-1} (NIRSYSTEMS, 2002).

4.7.2 *Composição Elementar*

A análise elementar (CNH%) da fibra lignocelulósica foi realizada a partir da combustão a 925 °C na presença de oxigênio puro, empregando mudanças na condutividade térmica para medir os produtos principais. Para a análise elementar utilizou-se equipamento Perkin-Elmer CHN 2400.

4.7.3 *Microscopia Eletrônica de Varredura*

O microscópio eletrônico de varredura – MEV permite conhecer de forma rápida a morfologia de amostras sólidas, consegue aumentos de 1.000.000 vezes ou mais e possui alta resolução (20 nm). Baseia-se em um feixe de elétrons para explorar a superfície da amostra, com aplicação de diferença de potencial, sendo o sinal transmitido a uma tela catódica que está sincronizada ao feixe. A microanálise por EDS é um acessório do MEV que possibilita a caracterização da composição da amostra. A técnica de EDS utiliza um detector de raios-X capaz de coletar fótons gerados pelo feixe de elétrons primários. Uma vez que os elétrons possuem energias diferentes, podem-se determinar os elementos químicos presentes no local de incidência do feixe (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microanálise por EDS (energia dispersiva) foram feitas em um Microscópio Eletrônico de Varredura, modelo VEGA3/TESCAN, equipado com detector SE, filamento de tungstênio a 10 e 20 kV, WD de 10 mm e EDS. Para realização dos ensaios as amostras foram secas e posteriormente foi depositada uma camada de ouro (técnica de sputtering), para a amostra se tornar condutora.

4.8 Estudos preliminares

Foram realizados estudos prévios para determinação das concentrações de substrato e bactéria utilizadas no processo de fermentação. Com base nos resultados encontrados, criou-

se o planejamento inicial com variáveis de 0-2 g de fibra lignocelulósica e 5-15 mL de bactéria *Escherichia coli*.

A concentração de glicerol utilizada foi de 50 mL para todos os ensaios, baseado em estudos anteriores, onde essa concentração foi a ideal para o processo de fermentação com o microrganismo utilizado no estudo.

Realizaram-se ensaios preliminares com base na cinética do processo fermentativo, a fim de determinar o tempo ideal de fermentação, no qual o período de 72 h foi o que melhor respondeu em termos de produção de metabólitos no modelo estudado.

4.9 Planejamento experimental

Foram realizados três planejamentos experimentais ²² com ponto central para o desenvolvimento do projeto utilizando o software Design-Expert®. As variáveis foram: concentração da fibra lignocelulósica e da bactéria *Escherichia coli*, utilizando-se 50 mL de glicerol para todos os ensaios.

As variáveis do planejamento inicial utilizado no processo de fermentação microbiológica são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Planejamento experimental inicial.

Variáveis		(+)		(-)
Substrato	Fibra (g)	2	1	0
	Glicerol (mL)	50	50	50
Bactéria	<i>E. coli</i> (mL)	15	10	5

A partir dos resultados do planejamento inicial foram realizados outros dois planejamentos experimentais, com a finalidade de encontrar as melhores condições para a produção de etanol do modelo estudado.

4.10 Fermentação

O inóculo em sistema fechado recebeu gás nitrogênio para formar um sistema em anaerobiose. As amostras foram inoculadas variando a quantidade de bactéria e fibra lignocelulósica em frascos Erlenmeyer de 250 mL conforme os ensaios previstos nos planejamentos.

Na Figura 10 podem ser observadas as amostras inoculadas e vedadas antes de ser

iniciado o processo de fermentação microbiológica.



Figura 10. Amostras do inóculo.

O processo de fermentação foi realizado em estufa micro processada de cultura e bacteriologia - Q316M/Quimis, por 72 h a $36^{\circ}\text{C} \pm 0,5$.

4.11 Destilação

A separação do álcool do concentrado fermentado pela *E. coli* foi por sistema de destilação simples.

Na Figura 11 pode ser observado o aparelho de destilação utilizado.

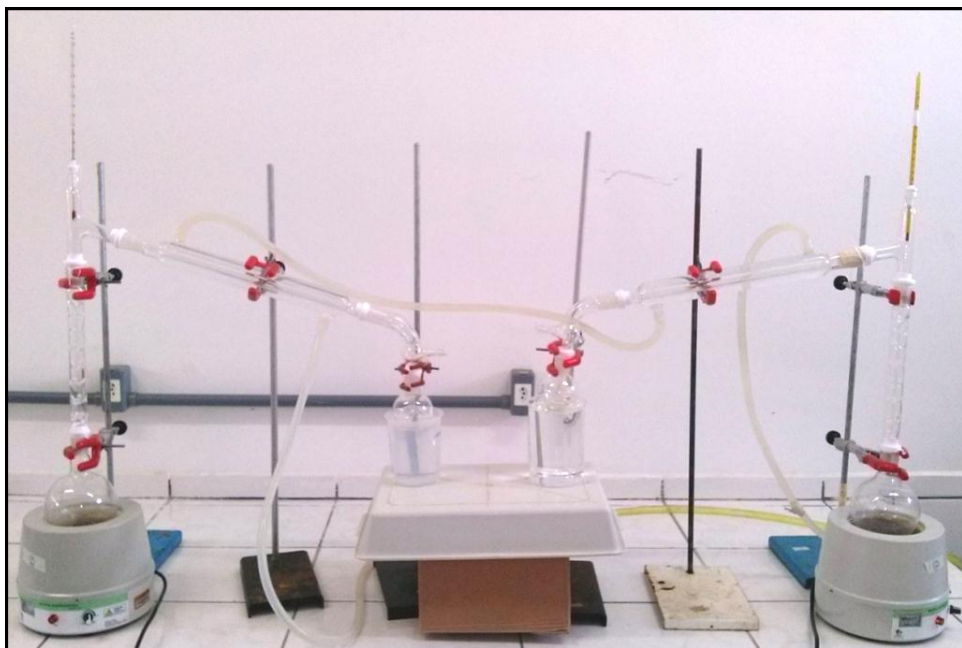


Figura 11. Aparelho de destilação simples.

O fracionamento ocorreu por diferenças entre os pontos de ebulição, onde a temperatura ideal para destilação do etanol foi de 70 °C. O mosto foi colocado no balão de destilação e aquecido à temperatura de 70 °C, quando a temperatura aumenta os compostos voláteis evaporam e são transferidos para o condensador do aparelho, onde voltam ao seu estado líquido e posteriormente são armazenados no balão de destilação.

O processo de destilação ocorreu pelo período de aproximadamente 2 h, até o ponto em que se conseguiu manter a temperatura constante em 70 °C, após o início de variação da temperatura a destilação foi interrompida.

4.12 Quantificação do teor de etanol no destilado bruto

A determinação do teor de etanol foi realizada utilizando-se o método NBR 13920, que consiste no uso de um espectrofotômetro na região do ultravioleta-visível. É baseado na oxidação do etanol a ácido acético, pela reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire tonalidade verde proporcional à concentração de etanol na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro a 600 nm. Foi realizada uma curva de calibração, e análise das amostras para obtenção do teor de etanol (ABNT, 1997).

4.12.1 Soluções empregadas

Para a realização dos ensaios foram preparadas soluções de dicromato de potássio, ácido sulfúrico concentrado e padrão de etanol absoluto.

A solução de dicromato de potássio a 10 % (m/v) foi preparada pesando-se 10,0 g de dicromato de potássio e diluindo-se em 100 mL de água destilada. A solução padrão de etanol absoluto foi feita medindo-se 0,190 mL de etanol absoluto e transferindo-se para um balão com 50 mL de água destilada.

4.12.2 Curva padrão

Para a realização da curva padrão, foram preparadas quatro soluções e um branco, contendo 0 (branco), 1, 2, 3 e 4 mL da solução padrão de etanol, e diluído até completar o volume de 5,0 mL com água destilada. Foi adicionado aos poucos pelas paredes do tubo 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente foi adicionado 1 mL da solução de dicromato

de potássio a 10%. Os pontos da curva padrão correspondem respectivamente a 0 mg, 3 mg, 6 mg, 9 mg e 12 mg de etanol.

Na Figura 12 é observada a curva de calibração para a realização dos ensaios.



Figura 12. Curva de calibração/UV-VIS.

4.12.3 Preparo das amostras e procedimento de leitura

Para o preparo das amostras foi transferida uma alíquota de 0,02 mL da amostra destilada para um tubo de ensaio e diluída em água destilada até completar o volume de 5,0 mL. Posteriormente adicionou-se lentamente 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado e após o resfriamento, 1 mL da solução de dicromato de potássio.

Para a leitura a amostra foi colocada em uma cubeta de quartzo de 1 cm³ e foi realizada a leitura no espectrofotômetro UV-VIS em 600 nm.

Na Figura 13 são apresentadas as amostras prontas para serem lidas no espectrofotômetro.

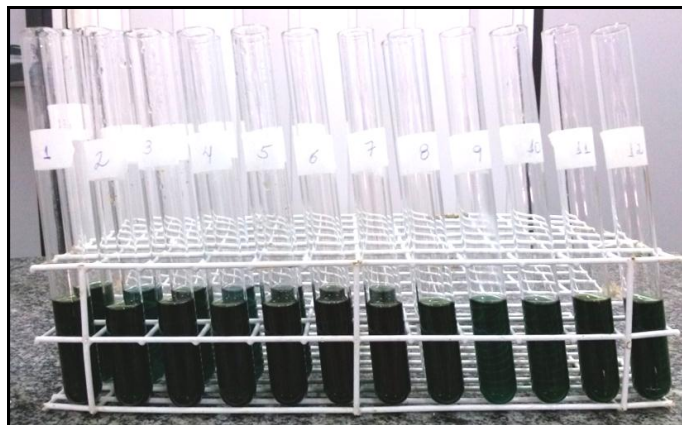


Figura 13. Amostras preparadas para análise.

Para determinação do teor de etanol em °GL foi utilizada equação (2):

$$E = 5000 \times E' / 0,78934 \times 1000 \text{ ou } E = 6,323 E' \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

E = teor de etanol na amostra, em mL / 100 mL (°GL);

E' = mg de etanol na alíquota, conforme leitura na curva-padrão;

5000 = fator de conversão da alíquota de 0,020 mL para 100 mL;

1000 = fator de conversão de MG para g;

0,78934 = densidade do etanol a 20°C, em g/mL.

4.13 Análise estatística

A análise estatística do estudo foi realizada utilizando-se o software Design-Expert®, para gerar a superfície de resposta e a tabela ANOVA para todos os meios estudados, sendo possível determinar os melhores parâmetros para produção do etanol.

4.14 Caracterização e análise físico-química do etanol

4.14.1 Cromatografia

A análise de cromatografia do etanol foi realizada em cromatógrafo a gás Shimadzu, equipado com detector de ionização em chama (CG-DIC) e acoplado a um auto amostrador AOC 5000 (*headspace*). Os componentes voláteis foram separados em coluna TRX1 (30m x 0,32mm x 3,0 um). As condições de operação foram: temperatura programada da coluna 50° C por 2 minutos, em seguida 10° C por minuto, até 150° C mantido por 3 minutos, totalizando 15 minutos; a temperatura do injetor foi de 150° C, gás de arraste hélio com fluxo de 1,40 mL/min; a detecção foi com detector aquecido a 200° C; o volume de injeção foi de 1 mL.

4.14.2 Aspecto e cor visual

As análises de cor e aspecto foram realizadas visualmente, de acordo com a norma NBR 14954, colocando-se a amostra em uma proveta e observando-se a presença de resíduos

sólidos e a coloração, a qual deve ser transparente (ABNT, 2011).

4.14.3 *Massa específica a 20 °C e teor alcoólico*

A determinação da massa específica e teor alcoólico foram feitas de acordo com a norma NBR 5992. Foi consultada a Tabela Alcoométrica de Conversão para massa específica a 20 °C e para o teor alcoólico em °INPM (ABNT, 2008).

4.14.4 *Potencial hidrogeniônico (pH)*

A análise pH foi feita pelo método potenciométrico (pHmetro), em conformidade com a norma NBR 10892, o qual é baseado na formação de um potencial elétrico na parede de um eletrodo específico (ABNT, 1990).

4.14.5 *Condutividade elétrica*

A análise de condutividade elétrica informa a capacidade do etanol de conduzir corrente elétrica, em função da presença de íons no combustível. A análise foi feita de acordo com a norma NBR 10547, por um condutímetro, acoplado a uma célula de condutividade elétrica e um sensor de temperatura (ABNT, 2012).

4.15 Cinética da fermentação

A cinética da fermentação é uma importante ferramenta para se avaliar o rendimento da bioconversão do substrato em biomassa e bioproduto, onde as concentrações de substrato, microrganismos e produto são analisadas em função do tempo de fermentação.

O estudo cinético foi realizado nas melhores condições de produção de etanol. Foi utilizado o modelo cinético descrito por Monod et al. (1941), onde os valores experimentais de concentração foram representados por X, P e S (MONOD, 1941; HISS, 2013).

Onde:

X = Concentração de microrganismo (*Escherichia coli*);

P = Produto do metabolismo (Etanol);

S = Substrato (Teor de açúcar).

Analisando-se as alterações das concentrações de X, P e S em função do tempo foram possíveis traçar as curvas de ajustes que representam o modelo estudado, onde $X=X(t)$, $S=S(t)$ e $P=P(t)$.

A velocidade específica de crescimento pode ser definida como a variação da concentração de microrganismos por um determinado tempo.

O cálculo da velocidade específica de crescimento (μ) foi realizado pela Equação (3):

$$\mu = 1/X * dX/dt \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde:

dX = Concentração de microrganismo;

dt = Variação de tempo;

μ = Velocidade específica de crescimento (h^{-1}).

A velocidade específica máxima de crescimento foi determinada pela equação (4):

$$\mu = \mu \text{ máx.} * S / (K_S + S) \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde:

$\mu \text{ máx.}$ = Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

K_S = Constante de saturação em g/L;

S = Concentração de substrato.

Os valores das velocidades específicas de consumo de substrato (μ_S) e formação do produto (μ_P) foram determinados de acordo com as equações (5) e (6):

$$\mu_S = (dS/dt) / dS \quad \text{(Equação 5)}$$

$$\mu_P = (dP/dt) / dP \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

dt = Variação de tempo;

dP = Concentração de produto;

dS = Concentração de substrato.

As determinações da concentração bacteriana e do teor de açúcar foram realizadas conforme descrito nos itens 4.15.1 e 4.15.2, respectivamente. O teor de etanol em °GL para a cinética da fermentação foi realizado de acordo com o item 4.12 utilizando-se o método de acordo com a norma NBR 13920.

4.15.1 Determinação da concentração bacteriana

Foi realizada a determinação da concentração bacteriana no inóculo base de *Escherichia coli*, sendo analisada a viabilidade e o crescimento celular. A determinação foi realizada pelo método de contagem em câmara de Neubauer, segundo Ceccato-Antonini (2010).

A câmara de Neubauer é uma lâmina especial, dividida em quadrados de 1 mm² de área. O método de contagem por câmara de Neubauer é realizado pela contagem das células viáveis na amostra, por coloração com azul de metileno. Em processos de fermentação alcoólica, a coloração das células com azul de metileno e o cultivo por plaqueamento são os mais utilizados.

Na Figura 14 é apresentada a câmara de Neubauer e uma representação dos campos de contagem.

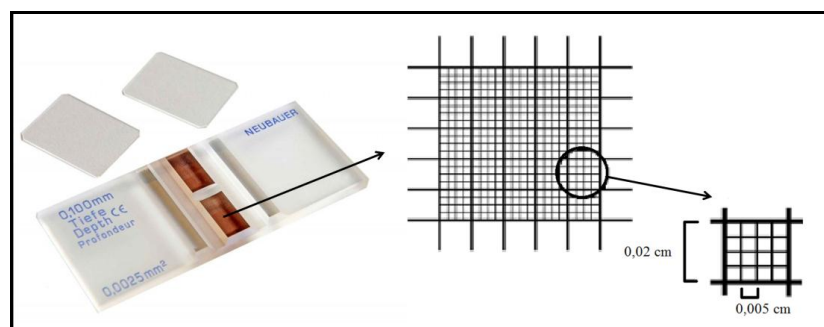


Figura 14. Câmara de Neubauer (CECCATO-ANTONINI, 2010).

A técnica consiste em misturar partes iguais da suspensão da amostra (*E. coli*) devidamente diluída, com a solução do corante (azul de metileno). As células com alta atividade fisiológica (vivas) não apresentam coloração, enquanto as células inativas (mortas) apresentam coloração azul. Transfere-se uma alíquota da amostra para a câmara de Neubauer e a contagem é feita em microscópio óptico na objetiva de 40X. São contados 5 campos na segunda coluna e 5 campos na quarta coluna, totalizando 10 campos.

A concentração bacteriana e a viabilidade das células foram determinadas pelas equações (7) e (8):

$$\text{Viabilidade (\%)} = (\text{N}^\circ \text{ de células vivas} / \text{N}^\circ \text{ total de células}) \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

$$\text{N}^\circ \text{ total de células/mL} = \text{N}^\circ \text{ células nos 10 campos} \times 2,5 \times \text{diluição} \times 10^4 \quad (\text{Equação 8})$$

4.15.2 Determinação do °Brix

A determinação do °Brix foi realizada por um refratômetro portátil para açúcar modelo RT-30ATC da marca Instrutherm, baseado na norma NBR 16223 (ABNT, 2013).

O °Brix pode ser definido como a quantidade de sólidos solúveis em um meio açucarado, onde 1 °Brix corresponde a 1 g de sólidos dissolvidos em 100 g de solução à 20 °C. Em amostras que apresentam alto teor de açúcares, o teor de °Brix representa uma medida aproximada do teor de açúcares presentes na solução (RODRIGUES; SANTOS, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do glicerol

5.1.1 Análise físico-química

Na Tabela 5 são apresentadas as análises físico-químicas do glicerol residual do biodiesel utilizado no projeto.

Tabela 5. Análise físico-química do glicerol.

Característica	Resultado	Unidade
Aspecto	Viscoso	-
Cor Visual	Marrom escuro	-
Potencial hidrogeniônico (pH)	7,29	-
Condutividade elétrica	349	$\mu\text{S}/\text{m}$
Densidade	1262,0	kg/m^3

As características do glicerol bruto dependem do tipo de ácido graxo empregado no processo de transesterificação para produção do biodiesel.

De acordo com a Tabela 5, o glicerol utilizado apresenta aspecto viscoso e cor marrom escuro. O valor de pH é de 7,29, sendo este adequado para o emprego em processos de fermentação com a bactéria *Escherichia coli*. A condutividade elétrica é de 349 $\mu\text{S}/\text{m}$ e a densidade 1262,0 Kg/m^3 . Os resultados encontram-se próximos aos existentes na literatura para glicerol bruto, subproduto do biodiesel (DODDABASAWA; PATIL, 2014; TIANFENG et al., 2013).

5.2 Caracterização da Fibra lignocelulósica

5.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IR)

Na Figura 15 encontram-se os grupos funcionais por Infravermelho (IR) da fibra lignocelulósica utilizada no processo de fermentação, o qual permitiu elucidar os grupos funcionais presentes no resíduo analisado.

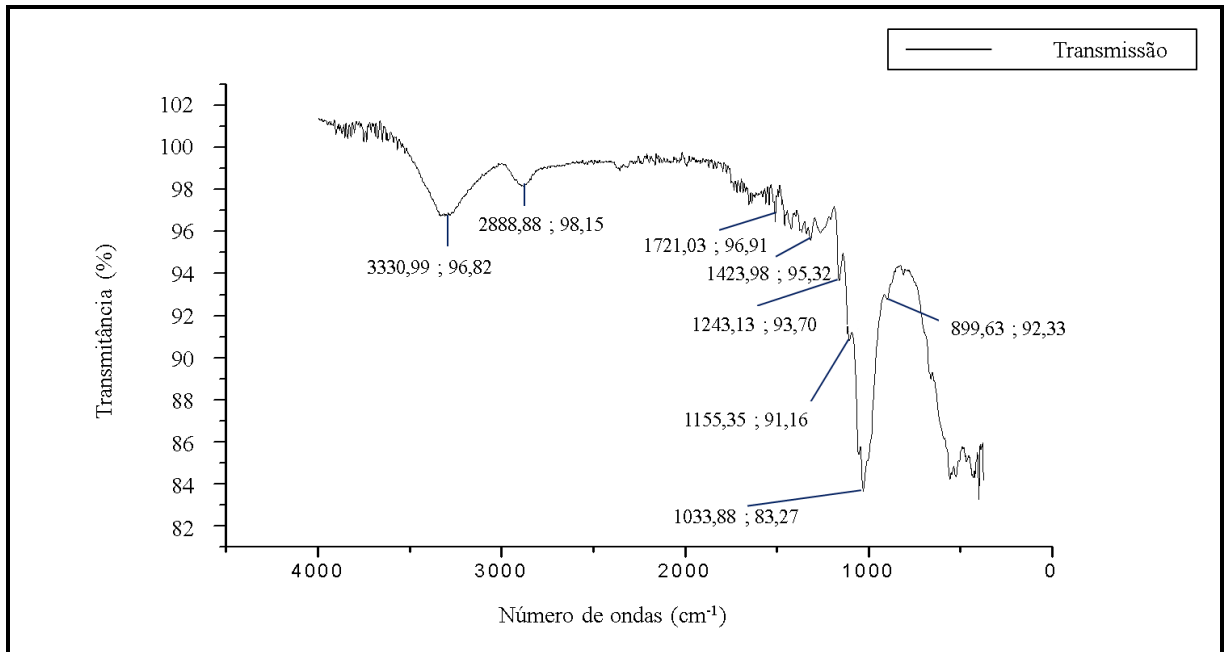


Figura 15. Espectro de IR da fibra lignocelulósica.

Analisando o espectro da fibra lignocelulósica pode-se observar um pico em 3330 cm^{-1} , o qual é característico desse tipo de material e está relacionado à deformação axial do grupo O-H. Outro pico foi observado em 2888 cm^{-1} que caracteriza vibrações de deformação axial do grupo C-H. Em 1721 cm^{-1} nota-se um pico associado à banda de carbonila (C=O), característico de hemicelulose. O pico visualizado em 1423 cm^{-1} é correspondente à deformação simétrica de CH_2 de celulose. O pico presente em 1243 cm^{-1} diz respeito a ligações C-O-C da cadeia de celulose e lignina da fibra. O pico observado 1155 cm^{-1} está associado à deformação assimétrica de C-O-C, também característico da hemicelulose e celulose. E o pico 1033 é característico a formação da cadeia C-O-H (LOPES, W. A.; FASCIO, 2004; MISTRY, 2009).

5.2.2 Composição Elementar

Na Tabela 6 são apresentadas as percentagens de carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O) obtidos pela análise química elementar da fibra lignocelulósica.

Tabela 6. Teores de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N), enxofre (S) e oxigênio (O).

Composição (m/m %)	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	O (%)
Fibra lignocelulósica	41,81	6,4	0,4	<1	50,39

Analisando a Tabela 6, pode-se observar que o teor de carbono representa 41,81%, o teor de hidrogênio 6,4%, o teor de nitrogênio 0,4%, o teor de enxofre menor que 1% e o teor de oxigênio 50,39%, valores próximos aos encontrados na literatura de resíduos similares (PROTÁSIO et al., 2013).

A proporção de carbono (C) e hidrogênio (H) interfere de forma positiva no poder calorífico, dessa forma, compostos que apresentam altos teores de C e H são mais interessantes na produção de energia. O baixo teor de nitrogênio (N) é o ideal em biomassas, visto que, concentrações maiores deste composto oferecem riscos ao meio ambiente, pois quando usadas em processos de combustão ocorre a emissão de gases poluentes como o óxido nítrico (NO_x) e o dióxido de enxofre (SO_2) (OBERNBERGER et al., 2006).

Com relação a processos de digestão anaeróbica, os teores de C e N são fundamentais para o desenvolvimento dos microrganismos. O carbono tem a função de fornecer energia, enquanto o nitrogênio auxilia na composição da estrutura celular (SGANZERLA, 1983).

5.2.3 Microscópio Eletrônico de Varredura – MEV

Na Figura 16 observa-se a imagem obtida pela micrografia eletrônica de varredura (MEV) da fibra lignocelulósica.

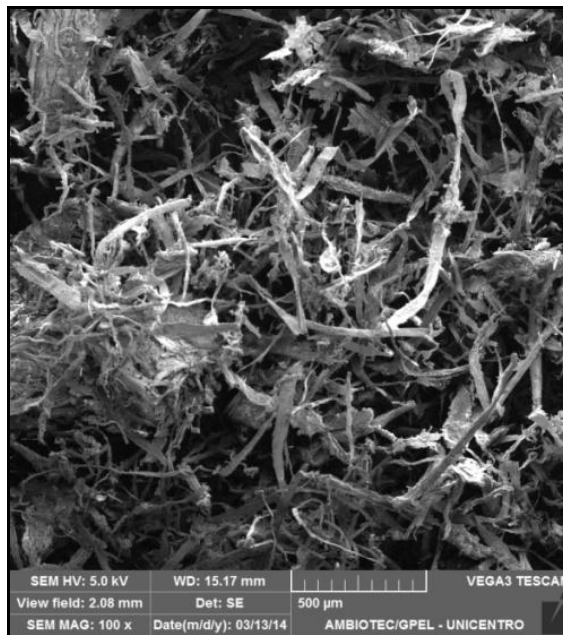


Figura 16. Imagem gerada por micrografia eletrônica de varredura (MEV) da fibra lignocelulósica.

A micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura permitiu avaliar os aspectos morfológicos da fibra lignocelulósica. Podem-se visualizar as fibras que compõe o resíduo, as quais apresentam a superfície irregular e heterogênea, pode-se perceber também que a estrutura encontra-se danificada, característica desse tipo de material.

Na Figura 17 encontra-se a imagem obtida pela micrografia com microanálise EDS da fibra lignocelulósica e na Figura 18 o espectro de EDS, essa técnica permite a identificação dos elementos químicos presentes na amostra.

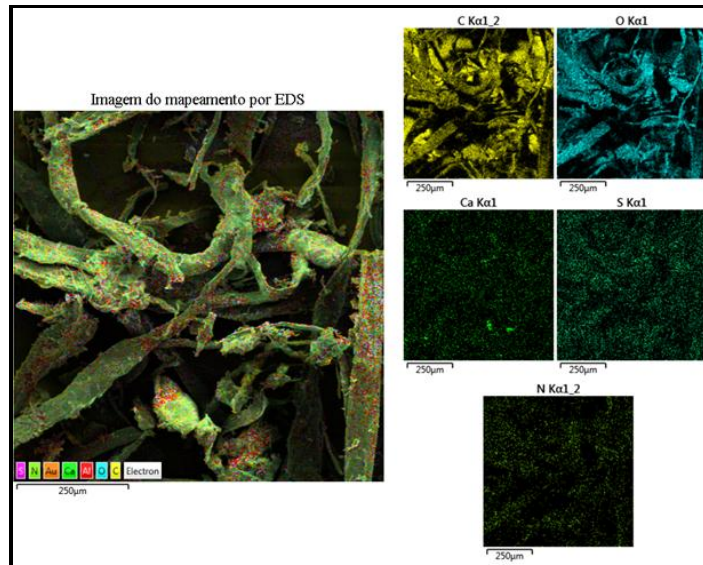


Figura 17. Imagem de micrografia com mapeamento por EDS da fibra lignocelulósica.

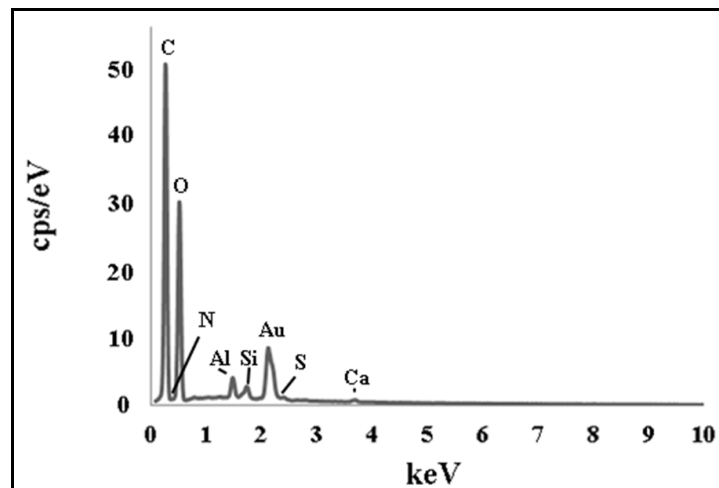


Figura 18. Espectro de EDS da fibra lignocelulósica.

Os resultados de EDS dos elementos químicos presentes na composição da fibra lignocelulósica, são de 41,7% de carbono, 18,79% de nitrogênio, 37,33% de oxigênio, 0,25% de enxofre e 0,53% de cálcio. Os valores de carbono e enxofre ficaram próximos ao

encontrado com a técnica de Análise Elementar (CNH%), porém a percentagem de nitrogênio apresentou diferença elevada. Essa diferença provavelmente ocorreu porque essa técnica não é a mais adequada para elementos mais leves.

Detectou-se na amostra impurezas como alumínio (1,34%), ouro e silício. O alumínio e o silício fazem parte da composição do suporte em que a amostra foi colocada. O ouro é proveniente da técnica de *sputtering*, na qual é depositado ouro no material a ser analisado para torna-lo condutor.

5.3 Quantificação do teor de etanol no destilado bruto

A quantificação do teor de etanol foi realizada de acordo com a norma NBR 13920, utilizando um espectrofotômetro na região do ultravioleta-visível.

Os teores de etanol obtido a partir da fermentação microbiológica do glicerol bruto (50 mL) e diferentes proporções de bactéria *Escherichia coli* e fibra lignocelulósica do planejamento inicial estudado encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Valores do teor de etanol no destilado bruto, para as variáveis: concentração de bactéria e proporção de fibra lignocelulósica para o planejamento inicial.

Ensaio	Bactéria (mL)	Fibra (g)	Etanol (°GL)
1	15	1	66±4,77
2	5	0	58±3,54
3	10	2	63±7,09
4	15	2	63±4,38
5	10	2	73±7,09
6	5	2	71±4,87
7	10	1	64±3,21
8	10	1	65±3,21
9	10	0	67±3,54
10	5	1	73±1,69
11	10	1	70±3,21
12	15	0	62±2,12
13	15	1	72±4,77
14	5	1	71±1,69
15	10	0	72±3,54
16	5	0	63±3,54
17	5	2	78±4,87
18	15	0	65±2,12
19	15	2	69±4,38

De acordo o programa estatístico Design Expert® os resultados obtidos no processo de fermentação seguem o modelo 2FI, o qual considera os efeitos dos fatores principais e suas interações.

Na Tabela 8 são apresentados os dados relacionados à tabela ANOVA para a superfície de resposta do modelo estudado.

Tabela 8. Tabela ANOVA para os ensaios do processo de fermentação do planejamento inicial.

Fatores e interações	Efeito	p-valor
Interceptação/Modelo	62.21491	0.0710
A-Bactéria	0.29167	0.2797
B-Proporção de fibra	8.25000	0.0665
AB	-0.57500	0.0829
Desvio padrão: 4.38	R ² : 0.3652	Erro padrão: 1.00

Conforme a Tabela 8 o modelo estatístico 2FI, apesar de não ser significativo, onde o valor p-valor é de 0,0710, representa 92,9% de nível de confiança.

A superfície de resposta dos ensaios estudados para as variáveis de concentração de bactéria e proporção de fibra, utilizando-se 50 mL de glicerol em todos os ensaios para o planejamento inicial encontra-se na Figura 19.

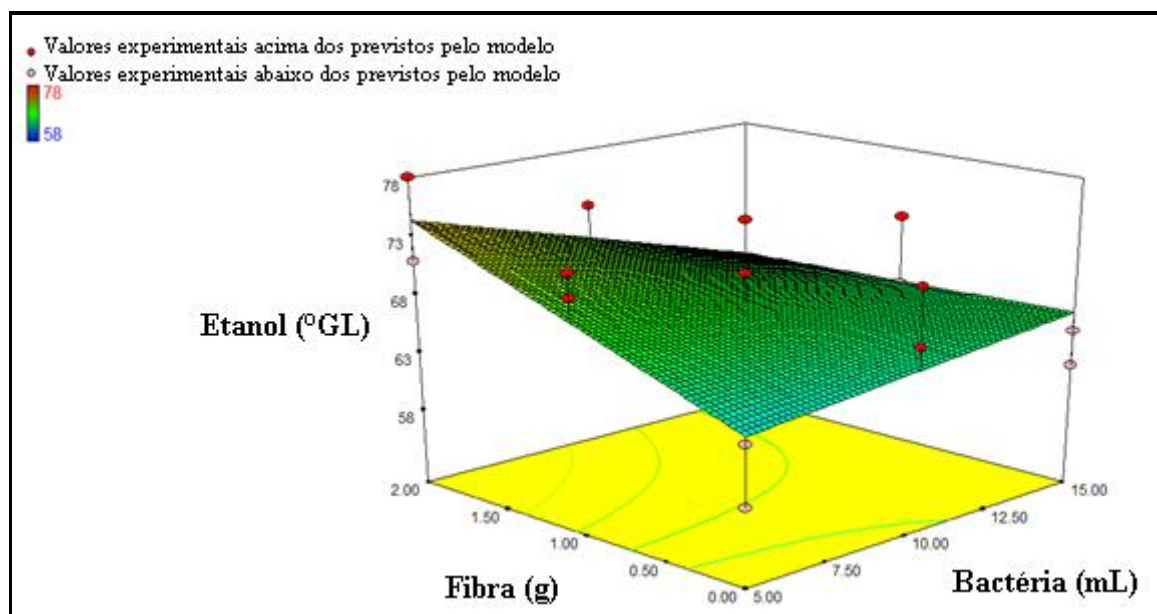


Figura 19. Superfície de resposta do sistema considerando os efeitos da bactéria *Escherichia coli* e fibra lignocelulósica para o planejamento inicial.

A Figura 19 representa a superfície de resposta dos ensaios, com 92,9% de significância. Nota-se uma tendência de maior produção de etanol quando a concentração de bactéria *Escherichia coli* é de 5 mL e 2 g de fibra lignocelulósica, ensaios 6 e 17 da Tabela 7, nesses ensaios o teor de etanol obtido foi de 71 e 78 °GL, respectivamente.

De acordo com os resultados do planejamento inicial foi realizado um segundo planejamento com o propósito de identificar as melhores condições de produção de etanol no processo de fermentação contendo o glicerol e a fibra lignocelulósica.

Os teores de etanol obtido pela fermentação no segundo planejamento são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Segundo planejamento experimental.

Ensaio	Bactéria (mL)	Fibra (g)	Etanol (°GL)
1	5	2	71±4,87
2	4	1	75±2,12
3	4	1	78±2,12
4	6	1	57±1,41
5	4	3	69±1,41
6	4	2	83±1,41
7	5	1	73±1,69
8	6	2	63±1,41
9	4	2	81±1,41
10	5	1	71±1,69
11	6	3	55±2,12
12	6	2	65±1,41
13	5	3	59±3,28
14	5	2	78±4,87
15	5	3	63±3,28
16	4	3	71±1,41
17	6	3	58±2,12
18	6	1	59±1,41

Observa-se na Tabela 9 que os melhores resultados obtidos foram nos ensaios 6 e 9, em concentrações de 4 mL de *E. coli* e 2 g de fibra lignocelulósica.

Na Tabela 10 são apresentados os dados relacionados à tabela ANOVA para a superfície de resposta do modelo estudado para o segundo planejamento de produção de etanol a partir da fermentação microbiológica.

Tabela 10. Tabela ANOVA para os ensaios do processo de fermentação do segundo planejamento.

Fatores e interações	Efeito	p-valor
Interceptação/Modelo	62.21491	0.0001
A-Bactéria	0.29167	0.0001
B-Proporção de fibra	8.25000	0.0015
AB	-0.57500	0.2134
Desvio padrão: 2.69	R ² : 0.9334	Erro padrão: 1.42

De acordo com a Tabela 10 o modelo estatístico que melhor representa os ensaios estudados é o quadrático, o qual é significativo, representando 99,9% de confiança. O valor do p-valor é de 0,0001, e indica forte tendência com relação a maior produção de etanol no estudo, como se pode observar na superfície de resposta da Figura 20.

Na Figura 20 é apresentada a superfície de resposta dos ensaios estudados para o segundo planejamento aplicado.

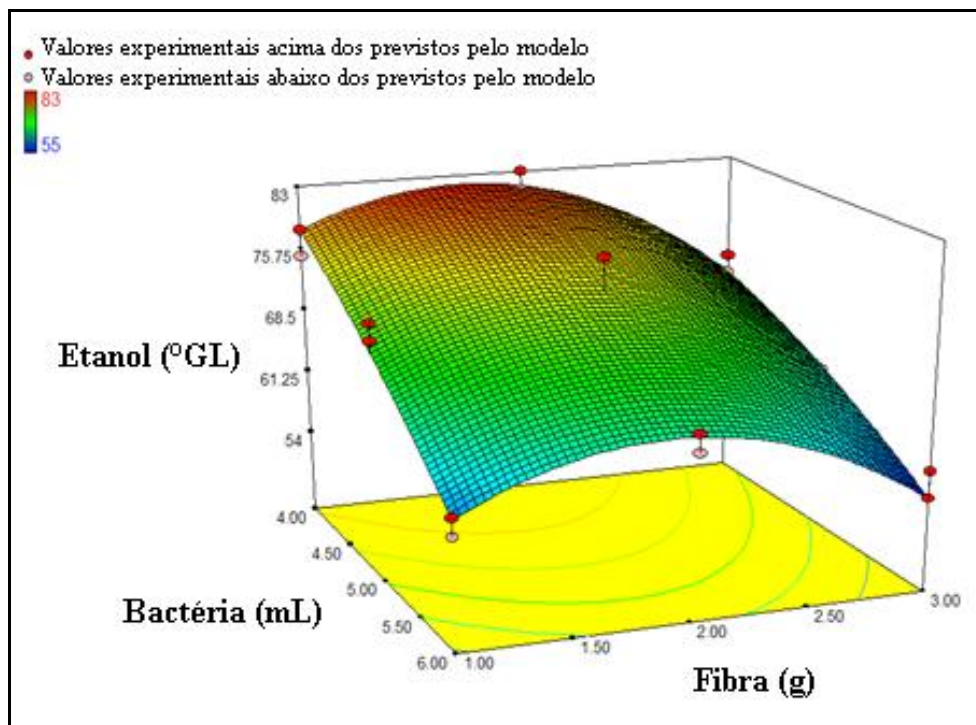


Figura 20. Superfície de resposta do sistema considerando os efeitos da bactéria *Escherichia coli* e fibra lignocelulósica para o segundo planejamento.

Encontra-se na Figura 20 a superfície de resposta dos ensaios para o segundo planejamento, com 99,99 % de significância.

Observa-se na superfície de resposta uma tendência de maior produção de etanol em concentrações de 4 mL de bactéria *Escherichia coli* e 2 g de fibra lignocelulósica (ensaios 6 e 9), em que o teor de etanol obtido foi de 83 e 81 °GL, respectivamente.

O estudo indica que concentrações maiores de bactéria não contribuem positivamente com o processo de fermentação. Com relação à proporção de fibra associada ao glicerol, a concentração de 2 g foi mais adequada na conversão microbiológica dos substratos pela bactéria *Escherichia coli* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

De acordo com os resultados do segundo planejamento realizou-se um terceiro planejamento com o objetivo de aperfeiçoar as melhores condições de produção de etanol pela conversão microbiológica dos substratos empregados no processo.

Na Tabela 11 são apresentados os resultados dos teores de etanol obtidos no terceiro planejamento de fermentação microbiológicas pela bactéria *Escherichia coli*.

Tabela 11. Terceiro planejamento experimental.

Ensaio	Bactéria (mL)	Fibra (g)	Etanol (°GL)
1	5	2	71±4,87
2	4	1	75±2,12
3	4	1	78±2,12
4	3	1	63±2,12
5	4	3	69±1,41
6	4	2	83±1,41
7	5	1	73±1,69
8	3	2	66±1,41
9	4	2	81±1,41
10	5	1	71±1,69
11	3	3	68±2,83
12	3	2	64±1,41
13	5	3	59±3,28
14	5	2	78±4,87
15	5	3	63±3,28
16	4	3	71±1,41
17	3	3	64±2,83
18	3	1	66±2,12

Os resultados do processo de fermentação neste planejamento seguem um modelo quadrático.

Na Tabela 12 são apresentados os dados relacionados à tabela ANOVA para a superfície de resposta do modelo estudado para o terceiro planejamento.

Tabela 12. Tabela ANOVA para os ensaios do processo de fermentação do terceiro planejamento.

Fatores e interações	Efeito	p-valor
Interceptação/Modelo	-113.83333	0.0002
A-Bactéria	80.25000	0.0538
B-Proporção de fibra	31.83333	0.0146
AB	-3.12500	0.0184
Desvio padrão: 3.24	R ² : 0.8389	Erro padrão: 1.71

Conforme a Tabela 12 o modelo quadrático é significativo, representando 99,8% de nível de confiança, sendo o valor p-valor de 0,0002. O estudo indica as melhores condições de produção de etanol para o modelo estudado de acordo com o programa estatístico.

A superfície de resposta dos ensaios estudados para o terceiro planejamento é apresentada na Figura 21.

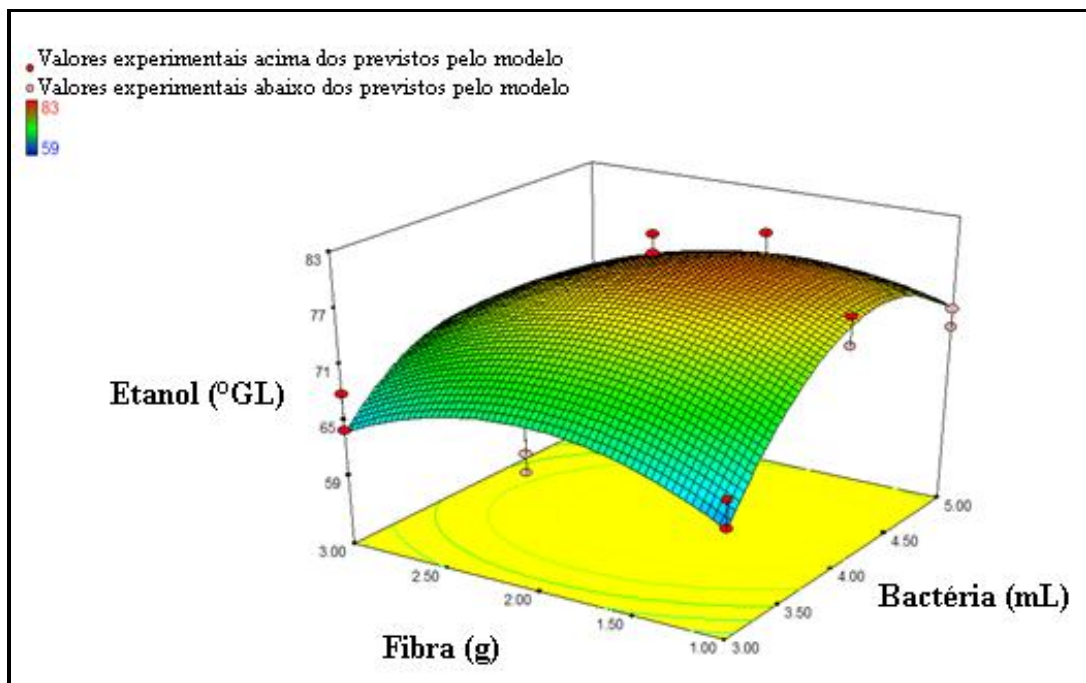


Figura 21. Superfície de resposta do sistema considerando os efeitos da bactéria *Escherichia coli* e fibra lignocelulósica para o terceiro planejamento.

O terceiro planejamento estudado apresenta 99,8% de significância. Analisando a superfície de resposta nota-se que a maior produção de etanol obtida (83 e 81 °GL) foi em concentrações de 4 mL de bactéria *Escherichia coli* e 2 g de fibra lignocelulósica, associados ao glicerol.

Esses resultados indicam o ponto ótimo de produção de etanol para o modelo estudado, onde a concentração de bactéria de maior eficácia ficou em 4 mL. Os resultados apontam que concentrações maiores de bactéria podem levar a um aumento exagerado da população bacteriana, impedindo o crescimento normal da população. Esse tipo de comportamento interfere no processo de fermentação e baixa a atividade metabólica da cultura bacteriana (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010).

Segundo o modelo, a proporção de 2 g de fibra lignocelulósica representa melhor contribuição no processo de fermentação junto com o glicerol. Mostrando que nessas concentrações as fontes de carbono empregadas no processo apresentaram elevada taxa de conversão microbiológica, resultando em maior rendimento de etanol no final do processo de fermentação (DAVIS et al., 1973).

Em proporções maiores de fibra lignocelulósica pode ter ocorrido uma saturação enzimática, o que tende a inativar a ação de enzimas essenciais que atuam na catálise da reação, não influenciando positivamente na velocidade da conversão dos substratos empregados no processo de fermentação e no desenvolvimento da população bacteriana (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A Figura 22 explica o comportamento da atividade enzimática no processo de fermentação de acordo com a concentração de substrato.

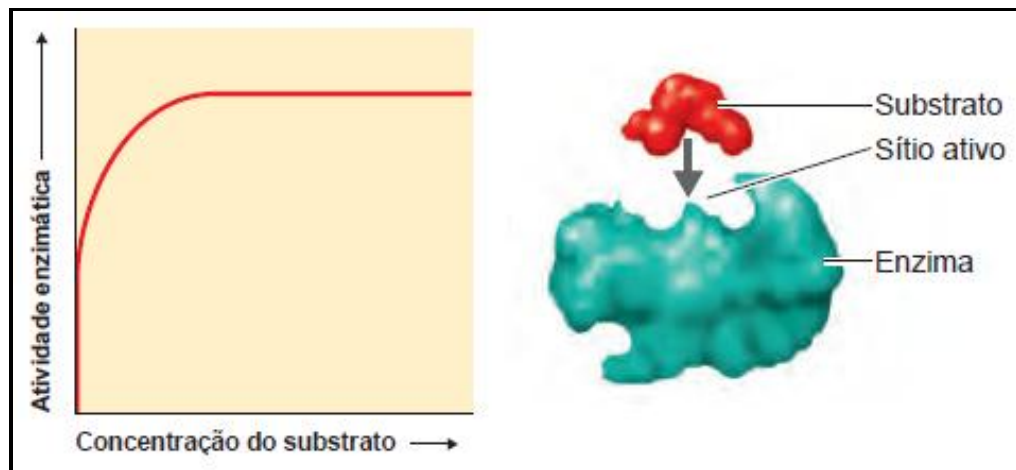


Figura 22. Atividade enzimática no processo de fermentação microbiológica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Na Figura 22 observa-se que quando ocorre o aumento da concentração de substrato a velocidade da reação tende a aumentar até o ponto em que os sítios ativos em todas as

moléculas da enzima sejam ocupados. No momento em que os sítios ativos são todos preenchidos se atinge a velocidade máxima da reação e a alta conversão dos substratos. Em concentrações elevadas de substrato, estando os sítios ativos todos ocupados, diz-se que a enzima está em saturação, e a velocidade da reação não é influenciada positivamente pela adição de mais substrato (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Na Figura 23 encontra-se a linha de contorno do modelo estudado para o terceiro planejamento e na Tabela 13 as melhores condições encontradas para produção de etanol.

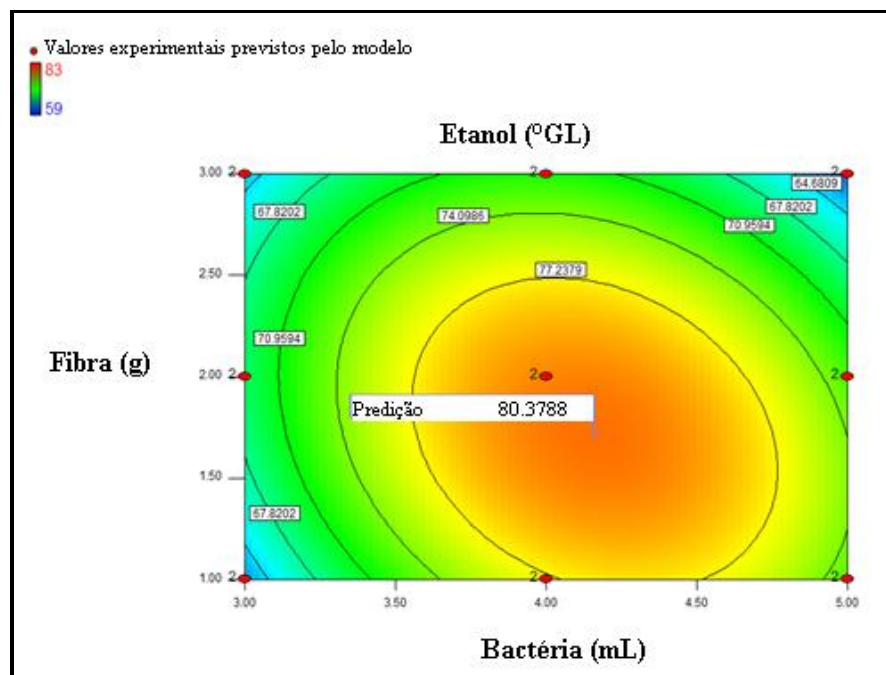


Figura 23. Linhas de contorno para os dados preditos pelo modelo quadrático, do processo fermentativo com a bactéria *Escherichia coli*.

Tabela 13. Melhores condições de produção de etanol.

Bactéria (mL)	Fibra (g)	Etanol (°GL)
4,16	1,71	80,37

Podem-se observar na Tabela 13 as melhores condições encontradas para produção de etanol dentro do sistema trabalhado, sendo de 4,16 mL de bactéria *Escherichia coli* e 1,71 g de fibra lignocelulósica, associadas a 50 mL de glicerol bruto.

A linha de contorno para o modelo estudado (Figura 23) sugere que seguindo as curvas de contorno e o mesmo procedimento descrito anteriormente, pode-se prever o volume

de etanol produzido dentro dos limites estudados, aproximadamente 80 °GL.

O modelo quadrático para este planejamento experimental pode ser representado pela equação (9):

$$\text{Etanol} = -113.83333 + 80.25000 * [\text{vol. bactéria}] + 31.83333 * [\text{proporção de fibra}] - 3.12500 * [\text{vol. bactéria}] * [\text{proporção de fibra}] - 9.00000 * [\text{volume de bactéria}]^2 - 5.50000 * [\text{proporção de fibra}]^2 \quad (\text{Equação 9})$$

5.4 Cromatografia do etanol

Observa-se na Figura 24 a análise cromatográfica do etanol obtido no processo de fermentação pela bactéria *Escherichia coli*, para os ensaios das melhores condições encontradas para produção de etanol no modelo estudado.

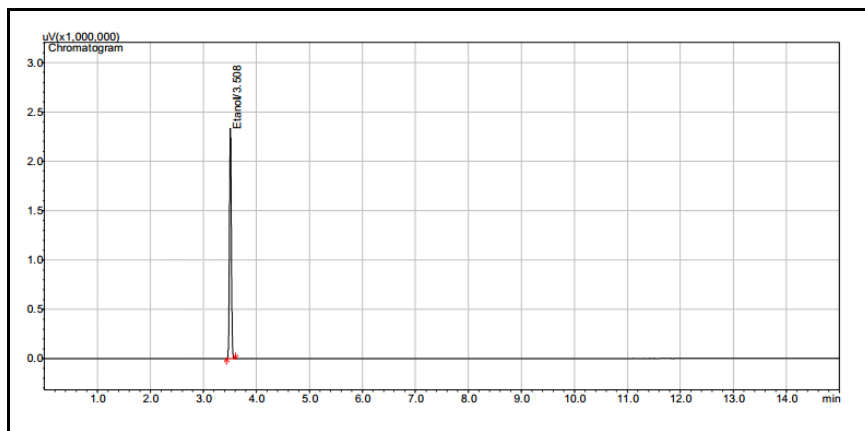


Figura 24. Cromatograma da amostra de etanol obtido com a fermentação microbiológica.

Ao analisar o resultado de cromatografia gasosa por headspace (CG-DIC), da amostra obtida com a destilação do fermentado pela bactéria *Escherichia coli*, pode-se verificar a presença de etanol. O resultado da análise cromatográfica confirma a presença de etanol nos ensaios do processo de fermentação utilizando-se como substratos glicerol e fibra lignocelulósica.

5.5 Análise físico-química do etanol obtido

As análises físico-químicas do etanol produzido foram realizadas em conformidade com a resolução ANP N° 7, de 14 de abril de 2011. Os parâmetros que foram determinados

encontram-se relacionados na Tabela 14.

Tabela 14. Análise físico-química do álcool gerado (ensaios 6 e 9 da Tabela 11).

Característica	Método	Especificação	Resultado	Unidade
Aspecto	NBR 14954	L.I.I (1)	L.I.I	-
Cor Visual	Visual	0 a 3 (2)	0	-
Massa específica a 20°C	ASTM D 4052	807,6 – 811,0	815,11	kg.m ⁻³
Teor alcoólico	NBR 5992	92,5 – 93,8	90,71	°INPM
Potencial hidrogeniônico (pH)	NBR 10891	6,0 a 8,0	8,65	-
Condutividade elétrica	NBR 10547	389 máx.	154,0	μS/m

(1) L.I.I = Límpido e Isento de Impurezas.

(2) Ofício nº 249 / 2006 / SQP. Incolor (cor 0) e no máximo cor 3.

Observa-se na Tabela 14 que os resultados referentes às análises de Aspecto e Cor encontram-se dentro do padrão, indicando a pureza do álcool e a ausência de contaminantes visíveis. Com relação a Massa específica o resultado (815,11 Kg.m⁻³) encontra-se acima das especificações da ANP, percebe-se que quando a massa específica aumenta o teor alcoólico diminui (90,71 °INPM), apesar de não estarem dentro das especificações os resultados encontram-se próximos dos valores estabelecidos pela ANP. O resultado de Potencial hidrogeniônico encontra-se em conformidade com as especificações da ANP, mantendo-se neutro. O valor de Condutividade elétrica (154,0 μS/m) está de acordo com as especificações, sendo o máximo permitido 389 μS/m.

5.6 Cinética da fermentação microbiológica

Na Figura 25 podem ser observados os valores do crescimento celular da população bacteriana do inóculo ($X = \text{Microrganismos}/\text{Escherichia coli}$) do processo de fermentação.

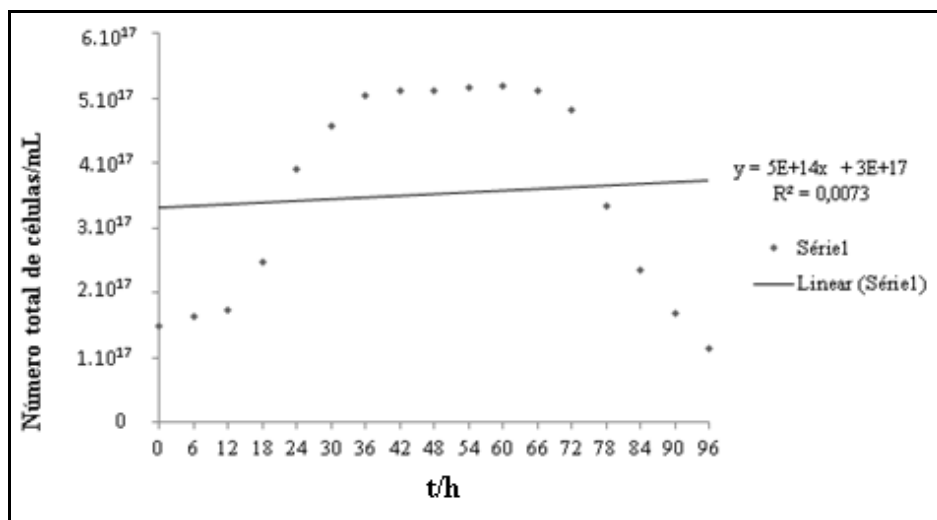


Figura 25. Comportamento da concentração celular de *Escherichia coli* em função do tempo.

Observa-se na Figura 25 o comportamento da concentração celular de *Escherichia coli* durante o processo de fermentação, no período de 0 a 96 h. O desenvolvimento da biomassa celular e a formação de produto são derivados da atividade fisiológica da bactéria em resposta as condições do meio de cultura. O número de células no inóculo inicial foi de $1,49 \times 10^{17}$, este período inicial de pouca divisão celular (0-12 h) é chamada de fase “lag”. Nessa etapa as células passam por processo de adaptação metabólica, com síntese de enzimas e moléculas, essenciais para manutenção e desenvolvimento das células. Após o período de 12 h de fermentação inicia-se a fase de crescimento, definido como fase log ou fase exponencial de crescimento. Durante esse período a reprodução celular é mais ativa, e se não ocorre limitações nutricionais o tempo de geração é constante (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; WILLEY; SHERWOOD; WOOLVERTON, 2008).

Quando o tempo de geração é constante, a representação do desenvolvimento celular durante a fase log origina uma linha reta, sendo este período o de maior atividade metabólica no processo fermentativo. Nessa fase a população bacteriana é mais uniforme se tratando de propriedades fisiológicas e químicas, de modo que, todos os componentes celulares são produzidos a taxas constantes em relação aos outros (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; WILLEY; SHERWOOD; WOOLVERTON, 2008).

A partir de 36 h de fermentação entra-se na fase estacionária, período em que a velocidade da reprodução se reduz, e o número de células viáveis são equivalentes as que morrem. Nessa etapa de fermentação a população bacteriana se estabiliza e a taxa de crescimento aparente pode ser considerada nula. A entrada na fase estacionária pode resultar de diversos fatores que atuam em conjunto, como a produção de inibidores, esgotamento do açúcar ou saturação da população. No tempo de 60 e 66 h de fermentação têm-se o máximo de células produzidas, chegando a $5,20 \times 10^{17}$ e $5,11 \times 10^{17}$, ocorrendo acúmulo de metabólitos e subprodutos como etanol, acetato, formato, succinato e lactato (GONZALEZ, et al., 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Até 72 h de fermentação a viabilidade da população é de 91%, após esse período o número de células mortas ultrapassa o número de células vivas, levando a fase de morte ou declínio logarítmico. Ocorre à diminuição da concentração de fonte de carbono e a elevada concentração de metabólitos produzidos, limita o crescimento bacteriano, levando ao declínio da população. No tempo de 96 h a concentração celular observada é de $1,14 \times 10^{17}$ e a viabilidade da população bacteriana baixou para 25% (TRABULSI, 1998).

Na Figura 26 pode ser observada a velocidade específica do crescimento celular do processo de fermentação no período de 0 a 96 h.

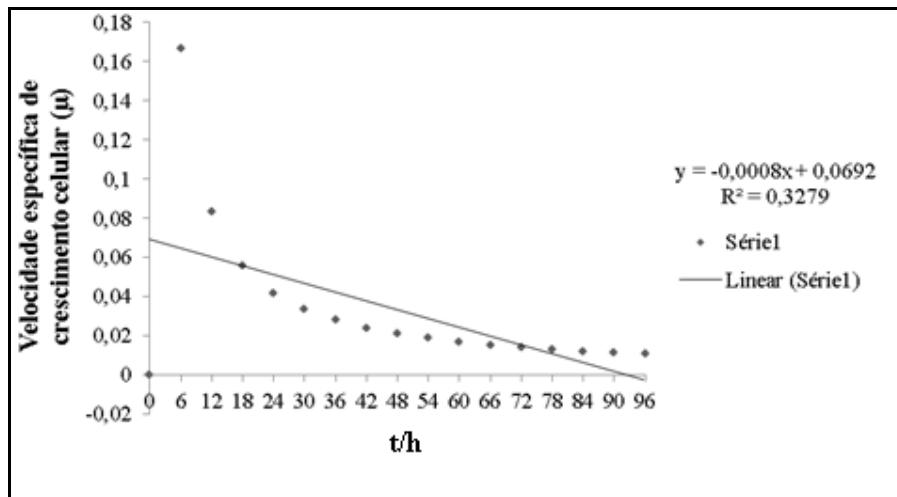


Figura 23. Velocidade específica de crescimento celular (μ) no processo de fermentação.

A velocidade específica de crescimento celular (μ) do processo fermentativo determinada pela Equação 10 foi de $0,016 \text{ h}^{-1}$, e a velocidade específica máxima (μ_m) de crescimento calculado pela Equação 4 foi de $0,018 \text{ h}^{-1}$. Esses valores indicam um processo de fermentação lento, porém próximo ao encontrado por Murarka et al. (2008) de $0,040 \text{ h}^{-1}$. A baixa velocidade pode ser decorrente da alta concentração de nutrientes no substrato utilizado, o que pode retardar a velocidade de crescimento.

Na Figura 27 é apresentado o consumo da concentração de açúcares ($^{\circ}\text{Brix}$) presentes no processo fermentativo em função do tempo.

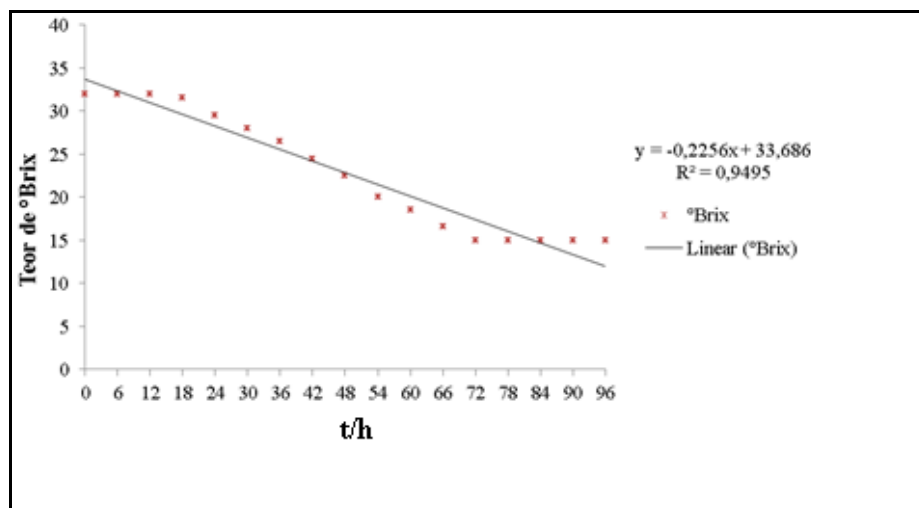


Figura 24. Comportamento da concentração de açúcares ($^{\circ}\text{Brix}$) em função do tempo.

A concentração inicial de açúcares no processo de fermentação foi de 32 °Brix, baixando gradualmente em função do tempo, chegando a 14 °Brix em 96 h de fermentação. A variação da concentração de nutrientes em uma cultura acompanha o desenvolvimento da população bacteriana, sendo aproveitada para geração de micro e macromoléculas durante o processo (TRABULSI, 1998).

Espera-se em processos de fermentação alcoólica que o valor de °Brix chegue a 0 no final do processo de fermentação, porém, isso não ocorreu nesse trabalho. Provavelmente devido à alta disponibilidade de nutrientes e açúcares presentes no meio, o que também leva a uma fermentação mais lenta por parte dos microrganismos (LIMA, U. A. et al., 2007).

Na Figura 28 é apresentada a velocidade específica do consumo de açúcares (°Brix) no processo de fermentação.

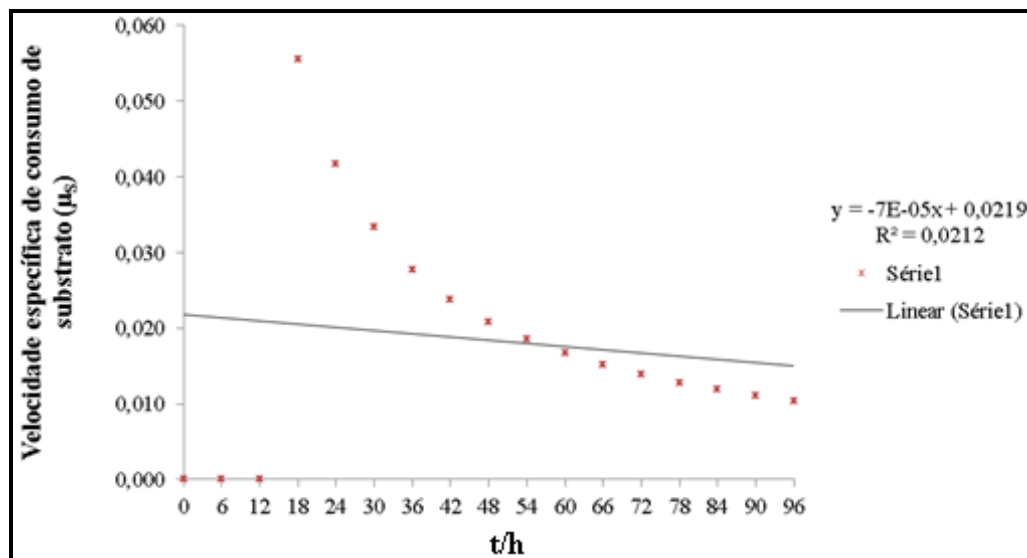


Figura 25. Velocidade específica do consumo de açúcares (°Brix) (μ_s).

A Figura 28 representa a velocidade específica do consumo de substrato (°Brix) no tempo de fermentação calculada pela Equação 12.

Analisando os resultados pode se perceber que a velocidade foi mais elevada nas primeiras h de fermentação, caracterizada como a fase log, a qual apresenta maior atividade metabólica e síntese de proteínas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; WILLEY; SHERWOOD; WOOLVERTON, 2008).

Na Figura 29 é observada a concentração de produto (Etanol) em função do tempo de fermentação.

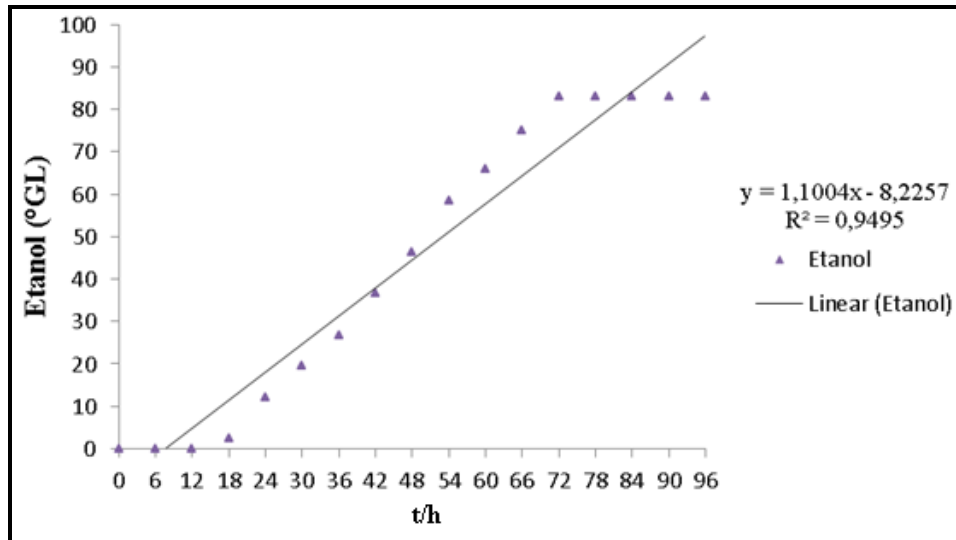


Figura 26. Comportamento da concentração da produção de produto em função do tempo.

A produção de etanol inicia-se na fase exponencial de crescimento dos microrganismos, sendo um metabólito primário do metabolismo das bactérias, a produção ocorre simultaneamente ao desenvolvimento da população.

Observa-se na Figura 29 que a produção de etanol inicia-se em aproximadamente 18 h do processo fermentativo, chegando à produção máxima no tempo de 72 h, após esse período não houve aumento na produção, provavelmente pela saturação de metabólitos e biomassa celular no sistema (TRABULSI, 1998; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010).

Na Figura 30 é apresentada a velocidade específica de formação de produto (Etanol) do processo de fermentação, determinada a partir da Equação 13.

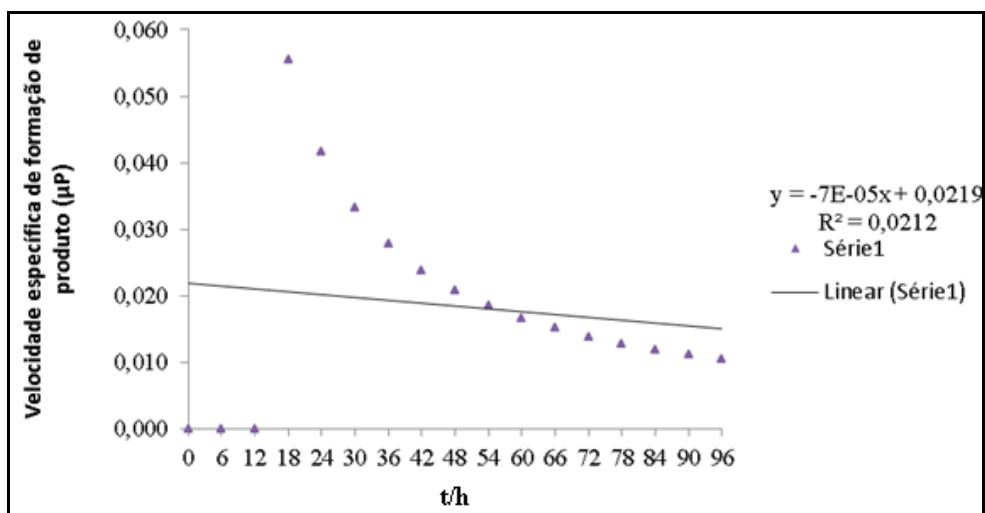


Figura 27. Velocidade específica da formação de produto (μ_P).

A formação de produto é associada ao crescimento celular, dessa forma, a velocidade apresenta-se mais elevada na fase em que a atividade metabólica bacteriana é maior, fase log do processo fermentativo. Essa fase inicia-se em 18 h e vai até aproximadamente 36 h, após esse período a velocidade específica de formação de produto tende a diminuir. A velocidade específica da formação do produto tende a ser proporcional a velocidade específica de consumo de substrato, devido ao comportamento característico do processo de fermentação pela bactéria *Escherichia coli* (TRABULSI, 1998; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010).

6. CONCLUSÕES

- A bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 demonstrou ser um microrganismo capaz de produzir etanol a partir de processo de fermentação dos resíduos industriais;
- O emprego do glicerol bruto como fonte de substrato para conversão microbiológica em etanol mostrou-se possível, sendo o glicerol considerado uma excelente fonte de carbono para aplicação em processos de fermentação;
- A proporção de fibra lignocelulósica influencia na produção de etanol a partir da fermentação microbiológica do glicerol;
- Os maiores teores de etanol obtido foram 83 e 81 °GL (4 mL de bactéria *Escherichia coli* e 2 g de fibra lignocelulósica), utilizando 50 mL de glicerol em todos os ensaios;
- O estudo cinético demonstrou que o tempo que compreende entre 12 h a 36 h de fermentação, foi o período em que ocorreu a maior produção de etanol no processo;
- As velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de açúcares (°Brix) e de produção de etanol foram superiores nas primeiras horas de fermentação, e diminuíram em função do tempo;
- Empregar resíduos industriais no processo de fermentação para produzir etanol se caracteriza como tratamento adequado para esses subprodutos, impulsionando a matriz energética e reduzindo problemas ambientais;
- O estudo demonstrou ser possível produzir etanol pela fermentação microbiológica do glicerol e de fibra lignocelulósica utilizando a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- (1) Caracterizar os resíduos gerados com a fermentação microbológica do glicerol e da fibra lignocelulósica.
- (2) Estudar a aplicação dos resíduos produzidos no processo.
- (3) Avaliar o potencial de produção de etanol usando somente o glicerol.
- (4) Analisar a produção de etanol utilizando apenas a fibra lignocelulósica por rota enzimática ou ácida.
- (5) Testar a aplicabilidade de outros microrganismos no processo de fermentação microbológica para geração de etanol.
- (6) Averiguar a resposta metabólica da bactéria *Escherichia coli* com variação de pH e temperatura do sistema.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13920: Determinação do teor alcoólico. São Paulo: ABNT, 1997.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10547**: Etanol combustível — Determinação da condutividade elétrica. Rio de Janeiro: ABNT/ ONS-034 Petróleo, 2012. 3 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10892**: Álcool etílico hidratado para a indústria alcoolquímica - Especificação. Rio de Janeiro: ABNT/CEE Comissão de Estudo Especial, 1990. 3 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14954**: Combustível destilado – Determinação da aparência. Rio de Janeiro: ABNT/ONS-034 Petróleo, 2011. 8 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16223**: Cana-de-açúcar — Determinação do Brix refratométrico do caldo. Rio de Janeiro: ABNT/ CEE-156 Cana de Açúcar, 2013. 2 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 5992**: Álcool etílico e suas misturas com água - Determinação da massa específica e do teor alcoólico - Método do densímetro de vidro. Rio de Janeiro: ABNT/ONS-034 Petróleo, 2008. 5 p.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 8112**: Carvão Vegetal - Análise Imediata. Rio de Janeiro: ABNT/CB-028 Siderurgia, 1986. 5 p.

ACHARJEE, T. C.; CORONELLA, C. J.; VASQUEZ, V. R.. Effect of thermal pretreatment on equilibrium moisture content of lignocellulosic biomass. **Elsevier: Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, n. 7, p.4849-4854, abr. 2011.

ADNAN, N. A. A. et al. Optimization of bioethanol production from glycerol by *Escherichia coli* SS1. **Elsevier: Renewable Energy**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p.625-633, jun. 2014.

AKHTARI, S.; SOWLATI, T.; DAY, K. Economic feasibility of utilizing forest biomass in district energy systems: A review. **Elsevier: Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 33, n. 6, p.117-127, jan. 2014.

ANEEL - AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA (Org.). **Atlas de Energia Elétrica do Brasil**. 9. ed. Brasília: ANEEL, 236 p., 2009

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. 2014. Rio de Janeiro: Anp, 2014. 252 p.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Elsevier: Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 7, n. 2, p.163-173, abr. 2014.

APOLINÁRIO, F. D. B. et al. Biodiesel e Alternativas para utilização da glicerina resultante do processo de produção de biodiesel. **Revista de Divulgação do Projeto Universidade Petrobras e If Fluminense**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p.141-146, 2012.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL. **E711-87**: Standard test method for gross calorific value of refuse-derived fuel by the bomb calorimeter. West Conshohocken, PA, United States: ASTM. 2004.

AVCI, A. et al. Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production by recombinant *Escherichia coli* FBR5 without detoxification. **Elsevier: Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 142, n. 7, p.312-319, maio 2013.

AYOUB, M.; ABDULLAH, A. Z. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. **Elsevier: Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 16, n. 5, p.2671-2686, jun. 2012.

BANERJEE, S. et al. : Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, p. 77-93, 2010.

BENEDETTI, O. I. S. et. al. Análise Preliminar da Produção de Etanol a partir de celulose: caminhos e desafios para a produção de Álcool no Rio Grande do Sul. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 2, p. 272-284, 2009.

EMBRAPA CERRADOS. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Editores técnicos: Fábio Gelape Faleiro, Solange Rocha Monteiro de Andrade. – Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 730 p.

BORSATO, D.; GALÃO, F. O.; MOREIRA, I. **Combustíveis Fósseis: Carvão e Petróleo**. Londrina: Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina, 169 p. 2005.

BP STATISTICAL (Org.). **BP Statistical Review of World Energy**. 63. ed. Londres: Bp Estatistical, 2014. 48 p.

BRACELPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. **Dados do Setor**. São Paulo: Bracelpa, 2014. 29 p.

BRACELPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. **Relatório de Sustentabilidade**. Brasília: Report Comunicação, 2010. 46 p.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. **Dispõe Sobre A Introdução do Biodiesel na Matriz Energética Brasileira; Altera As Leis nos 9.478, de 6 de Agosto de 1997, 9.847, de 26 de Outubro de 1999 e 10.636, de 30 de Dezembro de 2002; e Dá Outras Providências..** Brasília, 13 jan. 2005.

BRASIL. Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. **Dispõe Sobre A Adição Obrigatória de**

Biodiesel Ao óleo Diesel Comercializado Com O Consumidor Final; Altera As Leis N°s 9.478, de 6 de Agosto de 1997, e 8.723, de 28 de Outubro de 1993; Revoga Dispositivos da Lei N° 11.097, de 13 de Janeiro de 2005; e Dá Outras Providências.. Brasília, 24 set. 2014. Seção 1.

CAPARICA, R. et al.: Processo de obtenção do etanol pelo bioprocessamento de glicerol derivado de biodiesel utilizando *Escherichia coli* selvagem e ATCC 25922 - **BR1020130330353**, 20 dez. 2013. INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. 2013.

CARLSON, R. E SRIENC, F.: Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: Identification of reactions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, p. 1-19, 2004.

CECCATO-ANTONINI, S. R.: **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias.** São Carlos : EdUFSCar, 2010. 105 p.

CHEN, X. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production. **Elsevier: Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 31, n. 8, p.1200-1223, dez. 2013.

COFRÉ, O. et al. Optimization of culture media for ethanol production from glycerol by *Escherichia coli*. **Biomass And Bioenergy**, Puerto Real-spain, v. 37, n. 2, p.275-281, 6 dez. 2011.

CUSHION, E.; WHITEMAN, A.; DIETERLE, G.: Bioenergy Development: Issues and impacts for poverty and natural resource management. **Washington D. C: The World Bank.** 272 p. 2010.

DAVIS, B. et al. **Microbiologia.** 4. ed. São Paulo: Edart, 1973. 362 p.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura - aplicações e preparação de amostras:** Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60 p.

DEMIRBAS, A. **Biofuels - Green Energy and Technology.** Londres: Springer London Ltd, 2008. 348 p.

DHARMADI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic Fermentation of Glycerol by *Escherichia coli*: A New Platform for Metabolic Engineering. **Biotechnology And Bioengineering**, United Kingdom, v. 94, n. 5, p.821-829, maio 2006.

DODDABASAWA; PATIL, R. Physico-Chemical Analysis of Biodiesel Derived Glycerin and Saponification of Crude Glycerin with Different Concentrations of Sodium Hydroxide Lye. **International Journal Of Science And Research**, India, v. 3, n. 6, p.210-212, jun. 2014.

DURNIN, G. et al. Understanding and Harnessing the Microaerobic Metabolism of Glycerol in *Escherichia coli*. **Biotechnology And Bioengineering**, Texas, v. 103, n. 1, p.148-161, nov. 2008.

EPE - EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balço Energético Nacional 2014**. Rio de Janeiro: Empresa de Pesquisa Energética, 2014 a. 288 p.

EPE - EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Relatório Síntese - BEN 2014**. Rio de Janeiro: Empresa de Pesquisa Energética, 2014 b. 54 p.

EPE – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Demanda de Energia: 2050**. Rio de Janeiro: Empresa de Pesquisa Energética, 2014 c. 245 p.

EXXON MOBIL. **Panorama Energético: Perspectivas para 2040**: Destaques. Texas: Exxon Mobil, 2014. 20 p.

FARIAS, L. M.; SELLITTO, M. A. Uso da energia ao longo da história: evolução e perspectivas futuras. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 12, n. 17, p.7-16, 25 abr. 2011.

FARLEY, Joshua. Economia para um planeta pós-carbono. **Revista Necat**, Florianópolis, v. 2, n. 1, p.50-66, jul. 2012.

FERREIRA, I. T. M. et al. Estimativa do Potencial Energético de Resíduos Celulósicos de Fabricação de Papel Através de Análise Imediata. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, Curitiba, v. 3, n. , p.284-297, set. 2014.

FERREIRA, I. T. M.: **Descrição do Processo de Fabricação do Cartão Revestido**. Turvo: Ibema - Cia. Brasileira de Papel, 6 p. 2013.

FIGUEIREDO P. et al. The Texas A&m University System. **Transformation Of Glycerol And Cellulosic Materials Into High Energy Fuels**. EUA nº EP2313512 (A2), 16 jul. 2009, 27 abr. 2011.

FOLQUENIN, E. K. F. et al. Obtenção e Caracterização Físicoquímica do Biodiesel B100 e de Misturas Biodiesel/Diesel. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 13, p. 1-17, 2011.

GALLINA, A. L.; DIAS, B. V.; RODRIGUES, P. R. P.. Application of the Stainless Steel in the Hydrogen Generation as Fuel. **Revista Virtual de Química**, v. 6, p. 224, 2014.

GALLINA, A. L. et al. Chemometric study of biodiesel production from soybean oil. In: Formatex. (Org.). **Fuelling the Future: Advances in Science and Technologies for Energy Generation, Transmission and Storage**. 1ed.: BrownWalker Press, 2012, v. 1, p. 29-33.

GALLINA, A. L. et al. Estudo ambiental e socioeconômico da produção de biodiesel do óleo da *Cyperus esculentus*. **Ambiência**, v. 10, p. 303-317, 2014a.

GALLINA, A. L. et al. **Processo de produção de reator eletroquímico utilizando eletrodos de aço inoxidável austenítico tipo abnt 254 para geração de gás hidrogênio utilizando ácido fórmico e glicerina**. 2014. BR nº 10201402269, 19 set. 2014a. INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

GODOI, J. M. A.; OLIVEIRA Jr, S.; MATAI, P. H. DIMENSÕES GEOPOLÍTICAS E AMBIENTAIS DOS BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL. **Revista Interfacehs: Revista de**

Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade, São Paulo, v. 7, n. 1, p.34-51, ago. 2012.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Elsevier: Energy Policy**, Amsterdam, v. 36, n. 6, p.2086-2097, jun. 2008.

GOLDEMBERG, J.; JOHN, V. M. **Energia e Desenvolvimento Sustentável: Série Sustentabilidade**. São Paulo: Edgard Blucher, 2010. 94 p.

GOMES, A. C. et al. Petróleo Brasileiro S. A. - PETROBRAS (Brasil). **Processo de produção de um preparado enzimático para hidrólise de celulose de resíduos lignocelulósicos e sua aplicação na produção de etanol**. BR nº PI0805560-2 A2, 29 dez. 2008, 08 set. 2010. Instituto Nacional da Propriedade Nacional. 2010.

GONZALEZ, R. et al.: A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*. **Departments of Chemical & Biomolecular Engineering and Bioengineering**, Houston, v.10, p. 234-45. 2008.

HAYNES, W. M. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 92. ed. Boca Raton: Crc Press, 2012. 2656 p.

HERRMANN, H. W. et al.: Analysis of gases released in the glycerin microbiological fermentation in dextrose medium. In: Formatex Research Center. (Org.). **Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments**. 1ed.Espanha: Formatex Research Center, v. 1, p. 202-205. 2013.

HISS, H. **Cinética de Fermentações: Uma análise matemática da atividade microbiana**. São Paulo: Autor, 2013. 333 p.

HOWLAND, J. L. **Introdution to cell physiology: information and control**. New York: Macmillan, 1968. 214 p.

HU, H.; WOOD, T.K.: An evolved *Escherichia coli* strain for producing hydrogen and ethanol from glycerol. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 391: 1033-1038. 2010.

HUFFER, S. et al. *Escherichia coli* for biofuel production: bridging the gap from promise to practice. **Elsevier: Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 30, n. 10, p.538-545, out. 2012.

IEA - INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Key World Energy Statistics**. Paris: International Energy Agency (IEA), 2014. 82 p.

IGBP - INTERGOVERNMENTAL GEOSPHERE-BIOSPHERE PROGRAMME (São Paulo). **Uma visão da energia para um planeta sob pressão: Transição para a sustentabilidade: desafios interligados e soluções**. São José dos Campos: Green Ink, 2012. 8 p.

IPCC - INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate change 2014**. Genebra: Intergovernmental Panel On Climate Change, 2014. 116 p.

ITO, T. et al. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged

after biodiesel manufacturing process. **Elsevier: Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v. 100, n. 3, p.260-265, jul. 2005.

JIANG, H. et al. Continuous Cellulosic Bioethanol Fermentation by Cyclic Fed-Batch Cocultivation. **Aem/journalsasm: Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 79, n. 5, p.1580-1589, mar. 2013.

KANG, Z. et al. Engineering *Escherichia coli* for an efficient aerobic fermentation platform. **Elsevier: Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 144, n. 1, p.58-63, out. 2009.

KERBAUY, G. B.: **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 498 p. 2012.

KHANG, L.; WANG, W.; LEE, Y. Bioconversion of kraft paper mill sludges to ethanol by SSF and SSCF. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 53-66. 2010.

KIM, S. et al. Hydrogen production and metabolic flux analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* strains. **Elsevier: international journal of hydrogen energy**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p.7417-7427, jun. 2009.

KNOTHE, G.: Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress In Energy And Combustion Science**, Illinois - USA, n. , p.364-373, 24 dez. 2010.

KOVALSKI, G. et al.: Microbiological fermentation of glycerol to obtain alcohol in tryptose culture medium. In: Formatex Research Center. (Org.). **Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments**. 1ed. Espanha: Formatex Research Center, v. 1, p. 293-301, 2013.

LAU, M.W. et al.: Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. **Biotechnol. Biofuels**. 3: 11-20, 2010.

LEITE, R. C; CORTEZ, L. A. B.: O etanol combustível no Brasil. **Biocombustíveis no Brasil: realidades e perspectivas**. Brasília/DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 15p. 2012.

LIMA, E. A. Alternativa para estimar o preço da madeira para energia. **Embrapa**, Colombo, v. 260, n. 1, p.1-4, dez. 2010.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2007. 593 p.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Elsevier: Progress in Energy and Combustion Science**, Amsterdam, v. 38, n. 4, p.449-467, ago. 2012.

LIU, R. et al. Efficient succinic acid production from lignocellulosic biomass by simultaneous utilization of glucose and xylose in engineered *Escherichia coli*. **Elsevier: Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 149, n. 6, p.84-91, dez. 2013.

- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, Salvador, v. 27, n. 4, p.670-673, maio 2004.
- MABEE, W. E.; MCFARLANE, P. N.; SADDLER, J. N. Biomass availability for lignocellulosic ethanol production. **Elsevier: Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 35, n. 11, p.4519-4529, nov. 2011.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brook**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 1160. 2010.
- MAIA, E. C. R. et al. Study of the biodiesel B100 oxidative stability in mixture with antioxidants. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 1750-1755, 2011.
- MAIA, G. A. R. et al. Optimization of the alcoholic fermentation of aqueous jerivá pulp extract. **Acta Scientiarum**. Technology (Impresso), v. 36, p. 699-705, 2014.
- MAIOLINO S. Associação Brasileira de Celulose e Papel (Org.). Mudanças climáticas: Ações globais precisam ser efetivas. **Folha da Bracelpa**. São Paulo, p. 1-4. fev. 2013.
- MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia Ort, 2012. 320 p.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Biotecnologia Agropecuária**. Brasília: MAPA, 2010. 73 p.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Benefícios ambientais da produção e do uso do biodiesel**. Brasília: Secretaria Executiva - MAPA, 2014. 36 p.
- MARTÍNEZ, I.; BENNETT, G. N.; SAN, K. Metabolic impact of the level of aeration during cell growth on anaerobic succinate production by an engineered *Escherichia coli* strain. **Elsevier: Metabolic Engineering**, Amsterdam, v. 12, n. 1, p.499-509, set. 2010.
- MATOS, C. R. A. **Etanol e Biodiesel**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 105 p., 2012.
- MCTI - MINISTÉRIO DA CIÊNCIA TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no brasil**. 2. ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2014. 164 p.
- MDA - MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO. **Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel: Inclusão social e desenvolvimento territorial**. Brasília: Qualidade Gráfica Ltda, 2011. 48 p.
- MME - MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Plano Decenal de Expansão de Energia 2023**. Brasília: EPE/MME, 2014. 433 p.
- MISTRY, B. D. **A Handbook of Spectroscopic Data: Chemistry**. Jaipur: Oxford Book Company, 2009. 247 p.

MONOD, J. **Recherches sur la croissance des cultures bactériennes**. France: Paris : Hermann, 1941. 210 p.

MOTA, C. J. A.; PESTANA, C. F. M.: Co-produtos da Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 5, p.416-425, mar. 2011.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C.. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, São Paulo, 2009.

MURARKA, A. et al. Fermentative Utilization of Glycerol by *Escherichia coli* and Its Implications for the Production of Fuels and Chemicals. **Applied And Environmental Microbiology**, Texas, v. 74, n. 4, p.1124-1135, fev. 2008.

NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; SCHAECHTER, M. **Physiology of the bacterial cell: A molecular approach**. 7. ed. Masschesutts: Sinauer Associates, 1990. 506 p.

NIRSYSTEMS, F. **A guide to Near-Infrared Spectroscopic Analysis of Industrial Manufacturing process**. United States: Silver Spring, 2002.

OBERNBERGER, I.; BRUNNER, T.; BARNTHALER, G. Chemical properties of solid biofuels significance and impact. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 973-982, nov. 2006.

OJEDA, K.; SÁNCHEZ, E.; KAFAROV, V. Sustainable ethanol production from lignocellulosic biomass – Application of exergy analysis. **Elsevier: Energy**, Amsterdam, v. 36, n. 4, p.2119-2128, abr. 2011.

OLANYK, L. Z. et al. Avaliação das Emissões Gasosas, Parâmetros de Qualidade e Desempenho de Consumo de um Motor de Combustão Interna Operando com Misturas Gasolina/Adulterante em Diferentes Proporções. **Revista CIATEC-UPF**, v. 6, p. 15-30, 2014.

PACHECO, T. F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?. **Embrapa**, Brasília, v. 1, n. 1, p.1-6, abr. 2011.

PARIKH, J.; CHANNIWALA, S. A.; GHOSAL, G. K. A correlation for calculating HHV from proximate analysis of solid fuels. **Elsevier: Fuel**, Amsterdam, v. 84, n. 5, p. 487-494, março. 2005.

PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524 p. Tradução de: Sueli Fumie Yamada.

PROTÁSIO, T. P. et al. Técnicas multivariadas aplicadas à avaliação de resíduos lignocelulósicos para a produção de bioenergia. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 23, n. 4, p.771-781, out. 2013.

QUIRINO, W. F.; BRITO, J. O. CARACTERÍSTICAS E ÍNDICE DE COMBUSTÃO DE

- BRIQUETES DE CARVÃO VEGETAL. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**, Brasília, v. 13, n. 1, p.2-19, jun. 1991.
- QUIRINO, W. F. et al. Densitometria de raios x na análise da qualidade de briquetes de resíduos de madeira. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 40, n. 96, p.525-536, dez. 2012.
- QUIRINO, W. F. et al. Poder calorífico da madeira e de materiais ligno-celulósicos. **Revista da Madeira**, Porto Alegre, v. 89, n. 2, p.100-106, abr. 2005.
- RIVALDI, J.D. et al. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 37, p. 44-51, 2008.
- RODRIGUES, D. C. G. A.; SANTOS, T. T. **Manual da práticas de processos bioquímicos**. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro, 2011. 41 p.
- RODRIGUES, M. G.; COSTA, F. J. P.. Energia e sustentabilidade no século XXI: o caso do Brasil. **Revista Libero Americana de Ciências Ambientais**, Aquidabã, v.3, n.1, p.60-79, 2012.
- ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F.: O etanol de segunda geração: Limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, n. 32, p. 117-156, dez. 2009.
- SAHA, B. C.; COTTA, M. A.. Ethanol production from lignocellulosic biomass by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5. **Landes Bioscience: Bioengineered**, Usa, v. 3, n. 4, p.197-202, jul. 2012.
- SAXENA R. K. et al. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging oppurtunities. **Elsevier: Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 27, n. 6, p.895-913, jun. 2009.
- SGANZERLA, E. **Biodigestor: uma solução**. Porto Alegre: Agropecuária, 1983. 86 p.
- SILVA, F. V. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 13, n. 20, p.1-134, jul. 2012.
- SILVA, P. G. et. al. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, New York, v.27, p. 30-39, 2009.
- SIVAGURUNATHAN, P.; KUMAR, G.; LIN, C. Hydrogen and ethanol fermentation of various carbon sources by immobilized *Escherichia coli* (XL1-Blue). **Elsevier: international journal of hydrogen energy**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p.1-8, fev. 2014.
- SOUSA, P. N.; SCUR, G.; SOUZA, R. C. Panorama da cadeia produtiva do etanol no Brasil: Gargalos e proposições para seu desenvolvimento. **Gepros: Gestão da Produção, Operações e Sistemas**, Bauru, v. 7, n. 3, p.145-159, jul. 2012.
- SOUZA, L. G. A. **Redes de inovação em etanol de segunda geração**. 2013. 216 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo - USP, Piracicaba, 2013.

SUHAIMI, S. N. et al.: Bioconversion of glycerol for bioethanol production using isolated *Escherichia coli* SS1. **Brazilian Journal Of Microbiology**, São Paulo, v. , n. , p.506-516. 2012.

SVEN TESKE. Greenpeace Internacional. **Revolução Energética: A caminho do desenvolvimento limpo**. Santo André: Hawaii Gráfica & Editora, 2013. 80 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.: **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 596 p.

TAN, H. W.; AZIZ, A. R. Abdul; AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. **Elsevier: Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 27, n. 6, p.118-127, nov. 2013.

THOMAS, José Eduardo. **Fundamentos de engenharia de petróleo**. 2. ed. Brasil: Interciência, 2004. 272 p.

TIAGO FILHO, G. L. (Org.). **Energias Renováveis**. Itajubá: MME - Ministério de Minas e Energia, 44 p., 2007.

TIANFENG, C. et al. Purification of Crude Glycerol from Waste Cooking Oil Based Biodiesel Production by Orthogonal Test Method. **Scientific Research: China Petroleum Processing and Petrochemical Technology**, China, v. 15, n. 1, p.48-53, mar. 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.: **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre, Artmed, 2012. 920 p.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998. 386 p.

VARRONE, C. ENEA - Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (Roma). Crude glycerol fermenting process for the production of ethanol and hydrogen using activated sludge enriched and directly acclimatized on biodiesel by-product. **IT n° WO2013038435 A1**, 12 set. 2012, 21 mar. 2013. WIPO/PCT. 2013.

VIDAL, A. C. F.; HORA, A. B. Perspectivas do setor de biomassa de madeira para a geração de energia. **Papel e Celulose: BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, v. 33, n.1, p.261-314, mar. 2011.

VIOMAR, A.; BANCZEK, E. P.; RODRIGUES, P. R. P. Desenvolvimento de Catalisador Sólido a base de Nióbio para a transesterificação de Óleo de Soja. **Ambiência (Online)**, v. 8, p. 10, 2013.

WEC - WORLD ENERGY COUNCIL. **World Energy Resources**. Londres: World Energy Council (WEC), 2013. 468 p.

WEC, WORLD ENERGY COUNCIL. **Biofuels: Policies, Standards and Technologies**. London - Uk: Wec. 2010. 152 p.

WIECHETECK, M. Ministério do Meio Ambiente (Org.). Aproveitamento de resíduos e subprodutos florestais, alternativas tecnológicas e propostas de políticas ao uso de resíduos florestais para fins energéticos. **MMA: Projeto PNUD BRA 00/20**. Curitiba, p. 1-40. nov,

2009.

WILLEY, J. M.; SHERWOOD, L.; WOOLVERTON, C. J. **Prescott, Harley, and Klein's Microbiology**. 7. ed. United States: Mcgraw-hill Higher Education, 2008. 1088 p.

WMO - WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION. **The global atmosphere watch programe**: 25 Years of global coordinated atmospheric composition observations and analyses. Genebra: World Meteorological Organization, 2014 a. 48 p.

WMO - WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION. **Weather & Climate**: understanding risks and preparing for variability and extremes. 2. ed. Genebra: World Meteorological Organization, 2014 b. 52 p.

WOODRUFF, B. A. L.; NANETTER B.; RYANT G. Engineering improved ethanol production in *Escherichia coli* with a genome-wide approach. **Metabolic Engineering**, Colorado-USA, v. 17, n. 1, p.1-11, 29 jan. 2013.

YANG, L. et al. Microbial recycling of glycerol to biodiesel. **Elsevier: Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 150, n. 1, p.1-8, dez. 2013.

ZHAO, J. E SHIMIZU, K.: Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on C13-labeled acetate and glucose using GG-MS and powerful flux calculation method. **Journal of Biotechnology**, v. 101, p. 101-117. 2003.

ANEXOS

**Anexo I - Curriculum Vitae – Gláucia Kovalski
(dados somente durante a execução do mestrado)**

Dados Pessoais

Nome Gláucia Kovalski
Nascimento 20/02/1986

Formação Acadêmica/Titulação

- 2013 - 2015** Mestrado em Bioenergia. Bolsista Agência Capes.
Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, Brasil.
Título: Obtenção de etanol a partir da fermentação do glicerol e de resíduos da indústria de papel.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério Pinto Rodrigues
- 2009 - 2012** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, Brasil.
Título: Obtenção de álcool a partir da glicerina por processo microbiológico.
Orientador: Prof.^a Dr.^a Cynthia Beatriz Fürstenberger.
-

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos aceitos para publicação em periódicos

1 – Artigo aceito na Revista Tecnológica - Edição Especial de 2014, sob o “título Produção de etanol a partir da fermentação de resíduos industriais”. No prelo: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevTecnol>. 2015

Capítulos de livros publicados

1 – Capítulo do Livro: “Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments”, sob ISBN-13: 978-84-939843-7-3, 1 ed. Editor: Formatex Research Center, publicado no ano de 2013. Capítulo: Microbiological fermentation of glycerol to obtain alcohol in tryptose culture medium. p. 297-301.

2 – Capítulo do Livro: “Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments”, sob ISBN-13: 978-84-939843-7-3, 1 ed. Editor: Formatex Research Center, publicado no ano de 2013. Capítulo: Analysis of gases released in the glycerin microbiological fermentation in dextrose medium. p. 202-205.

Capítulos de livros aceitos para publicação

1 – Capítulo aceito no Livro: “Materials and technologies for energy efficiency”, 1 ed. Editor:

Formatex Research Center. Capítulo: “Industrial residue used to generate energy”. No prelo: <http://www.emr2015.org/files/EMR2015-Book-Abstracts.pdf>. 2015.

2 – Capítulo aceito no Livro: “Materials and technologies for energy efficiency”, 1 ed. Editor: Formatex Research Center. Capítulo: Microbiological Corrosion of Stainless Steel AISI 304 in Fuel and Biofuel. No prelo: <http://www.emr2015.org/files/EMR2015-Book-Abstracts.pdf>. 2015.

Trabalhos completos em Anais de eventos (nacionais e internacionais)

1 - Trabalho exposto no 8º Congresso Internacional de Bioenergia, sob o título “Produção de etanol a partir da fermentação do glicerol por *Escherichia coli*”, novembro/2013.

2 - Trabalho exposto no 8º Congresso Internacional de Bioenergia, sob o título “Obtenção de metano a partir da fermentação do glicerol”, novembro/2013.

3 - Trabalho exposto no 8º Congresso Internacional de Bioenergia, com o título “Produção de biogás a partir da fermentação do lodo residual de uma indústria de papel cartão”, novembro/2013.

4 - Trabalho exposto no 8º Congresso Internacional de Bioenergia, com o título “Determinação da corrosão do aço carbono SAE 1010 exposto a biodiesel na ausência e presença de *E. coli*”, novembro/2013.

5 - Trabalho exposto no 5º International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorization, com o título “Production of methane by the fermentation of glycerine and waste of pulp and paper industry”, agosto/2014.

6 - Trabalho exposto no 5º International Conference on Engineering for Waste and Biomass Valorization, com o título “Fermentation of glycerine and waste of pulp and paper industry for ethanol production”, agosto/2014.

7 - Trabalho apresentado no II Simpósio de Bioenergia e Biocombustíveis do Mercosul, com o título “Produção de etanol a partir da fermentação de resíduos industriais”, outubro/2014.

8 - Trabalho exposto no II Simpósio de Bioenergia e Biocombustíveis do Mercosul, com o título “Reaproveitamento de resíduos industriais para fins bioenergéticos”, outubro/2014.

9 - Trabalho apresentado no II Congresso do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais, sob o título “Transformação biológica de glicerol e de resíduos da fabricação de papel e celulose para produção de hidrogênio”, novembro/2014.

10 - Trabalho apresentado na XIX Semana de Iniciação Científica, com o título: “Produção de gás hidrogênio através da transformação biológica da glicerina utilizando resíduos da indústria de papel e celulose como substrato”, setembro/2014.

11 - Trabalho apresentado no XXIII Encontro Anual de Iniciação Científica EAIC, com o título: “Produção de biogás a partir da fermentação aeróbica do glicerol e de resíduos orgânicos de indústria de papel e celulose”, outubro/2014.

Resumos em anais de eventos (nacionais e internacionais)

1 - Trabalho exposto no The Energy & Materials Research Conference EMR 2015 Madrid, com o título: “Using agroindustrial waste to generate energy”, fevereiro/2015.

2 - Trabalho exposto no The Energy & Materials Research Conference EMR 2015 Madrid, com o título: “Microbiological Corrosion of Stainless Steel AISI 304 in Fuel and Biofuel”, fevereiro/2015.

Produção Técnica**Produtos tecnológicos com registro ou patente**

1 - Registro de patente solicitado junto ao INPI sob o número BR1020130330353, tendo como título “Processo de obtenção do etanol pelo bioprocessamento de glicerol derivado de biodiesel utilizando *Escherichia coli* selvagem e ATCC 25922”.