UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

**Avaliação de um reator tipo tambor rotativo
para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-
açúcar**

POLINE SALLES

São Carlos

2013

POLINE SALLES

**Avaliação de um reator tipo tambor rotativo
para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-
açúcar**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Área de Concentração: **Projetos Mecânicos**

Orientador: **Profº. Dr. Jaime Gilberto Duduch**

São Carlos

2013

ESTE EXEMPLAR TRATA-SE
DA VERSÃO CORRIGIDA.
A VERSÃO ORIGINAL
ENCONTRA-SE DISPONÍVEL
JUNTO AO DEPARTAMENTO DE
ENGENHARIA MECÂNICA DA
EESC-SP

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Salles, Poline
Sa   Avaliação de um reator tipo tambor rotativo para
         hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar /
         Poline Salles; orientador Jaime Gilberto Duduch. São
         Carlos, 2013.

         Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
         em Engenharia Mecânica e Área de Concentração em
         Projeto Mecânico -- Escola de Engenharia de São Carlos
         da Universidade de São Paulo, 2013.

         1. Hidrólise enzimática. 2. bagaço de
         cana-de-açúcar. 3. reator tambor rotativo. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Tecnóloga **POLINE SALLES**.

Título da dissertação: "Avaliação de um reator tipo tambor rotativo para hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar".

Data da defesa: 08/05/2013

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Associado **Jaime Gilberto Duduch (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Prof. Titular **Paulo Seleglim Junior**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Dr^a. **Patrícia Aparecida Santiago Monteiro**
(Pós-Doutorado/FAPESP)

aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica:
Prof. Associado **Marcelo Areias Trindade**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

*Dedico este trabalho a Deus, refúgio e fortaleza, a meus
pais e irmãos e meu querido esposo.*

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar, não apenas planejar, mas também acreditar”.

(Anatole France)

Agradecimentos

A Deus, consolador e fortalecedor, que me deu saúde e sabedoria durante o período de estudos e durante toda a minha vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Jaime Gilberto Duduch pela compreensão e apoio aos trabalhos realizados.

À Dr^a. Patrícia A.S. Monteiro e ao professor Dr. Paulo Seleglim Júnior. pela co-orientação e ajuda durante este período de estudo.

A minha querida amiga Daniela que a todo o momento foi solidária e muito companheira sempre disposta a me ajudar.

A todos os colegas de trabalho (Jonatan, Andrea, Melissa e Glauber) e técnicos do departamento de Núcleo de Engenharia Térmica e Fluidos que fizeram parte do meu trabalho.

À USP de São Carlos, aos Laboratórios do NETeF (Núcleo de Energia Térmica e Fluidos) e do Pólo Terra (Pólo Temático em Energias Renováveis e Ambiente/IFSC), ao CNPQ e a secretaria do programa de pós-graduação, em especial as funcionárias Iara e Ana Paula. À empresa Genencor (divisão da Danisco) pela doação da enzima Accellerase 1500® fundamental para a realização dos experimentos.

A meus pais, Luiz e Eliana, pelo amor, carinho e preocupação que sempre tiveram por mim e principalmente porque puderam me ouvir nas horas de dificuldade e meus queridos irmãos que tanto amo, Katusca, Luiz Henrique e Fábio por serem companheiros, alegres e por sempre acreditarem no meu sucesso.

Ao meu amado esposo Rudnei que me incentivou e sempre esteve ao meu lado, me apoiando e sendo meu companheiro em todos os momentos, os quais foram importantes para realização deste trabalho.

Finalmente a todos que contribuíram para realização deste sonho.

Obrigada!

Resumo

A conversão biológica de biomassa celulósica em combustíveis e produtos químicos oferece elevados rendimentos de produtos para a o sucesso da economia e futuramente o potencial de custos muito baixos. A hidrólise enzimática, que converte a biomassa lignocelulósica a açúcares fermentáveis é uma etapa complexa do processo. Um requisito importante no custo-eficiente no processamento de biomassa lignocelulósica é empregar um reator que assegure, ou até mesmo promova uma elevada conversão de celulose para glicose com uma mínima dosagem de enzima. O objetivo da utilização do reator é também de processar um elevado teor de matéria seca e, consequentemente, elevados níveis de celulose que conduzem a um aumento na concentração do produto. No entanto, nos processos que empregam altas cargas de sólidos, além da viscosidade elevada do meio reacional, outros fatores afetam o processo, além da inibição do produto, sendo estes as limitações decorrentes da transferência de massa e a agitação e mistura do meio. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi projetar um biorreator do tipo tambor rotativo para ser empregado no processo, em grande escala, de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Para alcançar este objetivo foram realizados experimentos, em escala de bancada, em um protótipo já existente no laboratório. Neste equipamento foi adicionado uma carga de sólidos de 10% (p/v) (bagaço de cana de açúcar, *in natura* e pré-tratado) e enzima celulase (Accellerase 1500® (Danisco)). Os resultados dos experimentos no reator mostraram um aumento na concentração de glicose (L^{-1}) convertida quando comparado com os realizados em frascos Erlenmeyer (controle). Isto ocorreu devido a melhor transferência de massa e de mistura no reator, sendo este mais eficiente, pois permite uma maior área de contacto da enzima com o substrato (bagaço).

Palavras-chave: Hidrólise enzimática; bagaço de cana-de-açúcar; reator tambor rotativo.

Abstract

The biological conversion of cellulosic biomass to fuels and chemicals offers high yields of products for the success of the economy and future the potential for very low costs. Enzymatic hydrolysis that converts fermentable sugars in lignocellulosic biomass is a complex step in this process. An important requirement in cost-efficient in the processing of lignocellulosic biomass is to employ a reactor that will ensure, or even promote, maximal conversion of cellulose to glucose with a minimum dosage of enzyme. The purpose of using the reactor is also for to process of high dry matter contents and therefore higher levels of cellulose that will also drive up the product concentration. However, the processes that emply high solid loadings, in addition to the high viscosity of the reaction mixture and other factors than product inhibition, notably mixing and mass transfer limitations. Within this context, the aim of this work was to design a bioreactor rotary drum to be used in the process, with large-scale enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse. To achieve this objective were performed in a bench scale, with prototype already existing in the laboratory. In this equipment was added a solids loading of 10% (w/v) (sugar cane bagasse, raw and pretreated) and cellulose enzyme (Accellerase 1500® (Danisco)). The results of the reactor experiments showed an increase in glucose concentration (L-1) converted when compared with those realized in Erlenmeyer flasks (control). This occurred because the mass transfer and mixing in the reactor is more efficient because it allows greater contact area of the enzyme with the substrate (sugarcane bagasse).

Key words: Enzymatic hydrolysis, sugarcane bagasse, rotary drum reactor.

Lista de Figuras

Figura 1: Fluxograma do processo para obtenção de bioetanol (DIAS <i>et al.</i> , 2012)	32
Figura 2: Composição do bagaço de cana-de-açúcar.....	33
Figura 3: Classificação dos biorreatores em fase aquosa – fermentação submersa: (a) STR, (b) coluna de bolhas, (c) “air-lift”, (d) “plug-flow”, (e) com células imobilizadas (leito fixo), (f) com células imobilizadas (leito fluidizado), (g) reator com membranas planas, (h) fibra oca ou “hollow-fiber” (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).....	38
Figura 4: Classificação dos biorreatores em fase não aquosa – fermentação em estado sólido (MITCHELL <i>et al.</i> , 2006).....	40
Figura 5: Biorreatores com aeração superficial sem agitação. (a) câmara climatizada; (b) estufa; (c) bandeja individual; (d) saco plástico (MITCHELL <i>et al.</i> , 2006).	41
Figura 6: Biorreatores com aeração forçada e sem agitação. (a) biorreator de leito empacotado; (b) biorretor de leito empacotado com duto central; (c) biorreator de leito empacotado com fluxo radial; (d) biorreator short-wide (MITCHELL <i>et al.</i> , 2006).....	42
Figura 7: Biorreatores com aeração forçada e agitação. (a) leito agitado; (b) tambor agitado; (c) tambor rotativo; (d) leito fluidizado (MITCHELL <i>et al.</i> , 2006).....	43
Figura8: Biorreatores com aeração superficial e agitação. (a) Biorreator de tambor rotativo; (b) Biorreator de tambor agitado (MITCHELL <i>et al.</i> , 2006).....	44
Figura 9: Variação de projeto e operação das variações do tambor rotativo (MITCHELL <i>et al.</i> , 2006).....	50
Figura 10: a) Uso de aletas angulares internas e inclinação do eixo do cilindro promovendo mistura axial para uso em reatores tambores rotativos b) Angulo dinâmico de repouso para agitação do leito, representando um limite superior para a inclinação do eixo do tambor que deve ser usado (MITCHELL <i>et al.</i> , 2006).	51

Figura 11: Diagrama esquemático da seção transversal do cilindro.....	54
Figura 12: Representação esquemática do protótipo do biorreator tambor rotativo já existente e utilizada nos experimentos com bagaço de cana-de-açúcar.....	59
Figura 13: Representação esquemática do sistema para operação do biorreator tambor rotativo	59
Figura 14: Curva de concentração de glicose liberada durante a hidrólise enzimática (g/L) vs tempo (h).....	65
Figura 15: Desenho de conjunto final do biorreator tambor rotativo	69

Lista de Tabelas

Tabela 1: Formas de movimentação transversal do tambor rotativo (MELLMANN, 2001)...	48
Tabela 2: Equipamentos utilizados para experimentos laboratoriais.....	58
Tabela 3: Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar.....	64
Tabela 4: Resultados dos cálculos para regime de escoamento	70

Lista de Símbolos

R	- raio do tambor	[m]
g	- aceleração da gravidade	[9,81 m/s ²]
N_c	- velocidade crítica rotacional	[rpm]
D	- diâmetro do tambor	[m]
f	- grau de enchimento	-
L	- Comprimento do cilindro	[m]
t	- Tempo	[s]
F	- Frequência ou velocidade de rotação	[Hz]

Símbolos gregos

ω	- velocidade angular do tambor	[rad/s]
ε	- ângulo de enchimento ou metade do ângulo do segmento circular ocupado pelos sólidos	[graus ou rad]

Adimensionais

Fr	- Froude	-

Lista de Apêndices

Apêndice A: Desenho de conjunto do biorreator para hidrólise enzimática.

Apêndice B: Desenho da camisa interna do biorreator para hidrólise enzimática.

Apêndice C: Desenho da camisa externa do biorreator para hidrólise enzimática.

Sumário

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	27
1.1. INTRODUÇÃO	27
1.2. OBJETIVOS.....	28
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DO BIOETANOL	31
2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	32
2.2.1. CELULOSE	33
2.2.2. HEMICELULOSE	34
2.2.3. LIGNINA	34
2.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	35
2.4. BIORREADORES.....	36
2.4.1. CLASSIFICAÇÃO DOS BIORREADORES	37
2.5. BIORREADORES EM FASE AQUOSA – FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	37
2.6. BIORREADORES EM FASE NÃO AQUOSA – FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA.....	39
2.6.1 BIORREADORES COM AERAÇÃO SUPERFICIAL E SEM AGITAÇÃO.....	40
2.6.2 BIORREADORES COM AERAÇÃO FORÇADA E SEM AGITAÇÃO	41
2.6.3 BIORREADORES COM AERAÇÃO FORÇADA E COM AGITAÇÃO.....	42
2.6.4 BIORREADORES COM AERAÇÃO SUPERFICIAL E COM AGITAÇÃO	44
2.7 VANTAGENS E DESVANTAGENS ENTRE BIORREADORES DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA E BIORREADORES DE FERMENTAÇÃO SEMI-SÓLIDA.....	44
2.8 BIORREATOR DO TIPO TAMBOR ROTATIVO	45
2.9. MOVIMENTAÇÃO DAS PARTÍCULAS EM BIORREADORES DO TIPO TAMBORORES ROTATIVOS	46
2.10. VARIAÇÕES DE PROJETO E OPERAÇÃO PARA BIORREATOR TAMBOR ROTATIVO	50
2.11. CRITÉRIOS PARA SELEÇÃO DO BIORREATOR	51
FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	53
3.1. CÁLCULO DO NÚMERO FROUD (Fr)	53
3.2. CÁLCULO DO GRAU DE ENCHIMENTO (f)	54
3.3. CÁLCULO DA VELOCIDADE CRÍTICA (N_c)	55
MATERIAIS E MÉTODOS	57

4.1. BIOMASSA	57
4.2. ENZIMA CELULASE	57
4.3. EQUIPAMENTOS	58
4.4. PROTÓTIPO DO BIORREATOR TIPO TAMBOR ROTATIVO	58
4.5. UNIDADE EXPERIMENTAL MONTADA PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	59
4.6. METODOLOGIA	60
4.6.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TOTAL DAS CELULASES	60
4.6.2. QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE	60
4.6.3. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	61
4.6.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM FRASCOS ERLLENMEYERS E EM BIORREATOR TAMBOR ROTATIVO	62
RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	63
5.1.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	64
5.2. PROPOSTA PARA CONSTRUÇÃO DO BIORREATOR TIPO TAMBOR ROTATIVO	68
5.2.1. SISTEMA DE AGITAÇÃO E GRAU DE ENCHIMENTO	69
CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	71
CONCLUSÕES	71
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
APÊNDICES.....	83
<i>Apêndice A: Desenho de conjunto do biorreator para hidrólise enzimática.....</i>	<i>84</i>
<i>Apêndice B: Desenho da camisa interna do biorreator para hidrólise enzimática. ....</i>	<i>85</i>
<i>Apêndice C: Desenho da camisa externa do biorreator para hidrólise enzimática.....</i>	<i>86</i>

Introdução e Objetivos

1.1. Introdução

Ao longo dos anos vêm se intensificando as pesquisas para um melhor aproveitamento dos resíduos agrícolas para obter combustíveis renováveis como o bioetanol, contudo há desafios que precisam ser investigados. O problema mais controverso em utilizar matérias-primas lignocelulósicas em combustível é, principalmente, a viabilidade econômica (CHEN, 2010).

O etanol é produzido, tradicionalmente, pela fermentação de açúcares extraído principalmente, da cana-de-açúcar, do milho, da beterraba e outras fontes. Outra via para a produção de etanol é empregando biomassa lignocelulósica obtida pelo bagaço de cana-de-açúcar, palha de cana, casca de arroz, caniço, entre outros (OGEDA & PETRI, 2010).

No Brasil, a ampliação da produção do bioetanol favorece uma posição privilegiada pelo fato de apresentar grande potencial de cultivo de matéria-prima renováveis e culturas agrícolas de grande extensão. O uso do bioetanol também contribui para redução de emissões de gases efeito estufa proveniente da cana-de-açúcar que substitui a gasolina e ainda, o fato de que não existem restrições quando ao uso de uma mistura de 10% ou mais de bioetanol (E10) à gasolina utilizada nos atuais veículos (MELO *et al.*, 2009).

Outros grandes países também produtores de bioetanol de cana-de-açúcar, tais como a Índia e China, estão realizando esforços para ampliar suas produções. Se comparado ao Brasil, estes países são menos competitivos devido ao clima, qualidade e disponibilidade de solo. A iniciativa de ampliação favorece o Brasil para formação de um mercado internacional de etanol, em função do seu avanço tecnológico (MELO *et al.*, 2009). Segundo

OCTAVIANO (2011), o Brasil precisa investir em biomassa e na melhoria genética da cana-de-açúcar para a produção do bioetanol. A idéia é investir em pesquisas tecnológicas para maximizar o uso de biomassa e torná-las mais baratas, resultando em biomassa de qualidade disponível, variedade genética, mecanização, logística e adaptação industrial (CHEN, 2010).

Para produção do bioetanol, o uso da biomassa para hidrólise enzimática é o foco dos estudos. A hidrólise é a quebra das moléculas de celulose em componentes (sendo eles a lignina e os açúcares C5 e C6). Embora a hidrólise enzimática apresente muitos desafios para sua viabilidade tecnológica, a preparação de matéria-prima, a necessidade de enzimas de alta eficiência e adaptação das usinas existentes, ainda é viável do ponto de vista sustentável e econômico (OCTAVIANO, 2011).

No estágio tecnológico atual, pode-se produzir 69,1 L de bioetanol por tonelada de bagaço, após as etapas de pré-tratamento e hidrólise, com aproveitamento das hexoses. Em cenário otimista de desenvolvimento tecnológico, estima-se produzir 149,3 L por tonelada de bagaço com aproveitamento das hexoses e pentoses (MELO *et al.*, 2009).

A proposta para o uso de bioetanol é diminuir a produção de energia elétrica através da cogeração de energia, pois, a biomassa que, atualmente, é destinada para geração de eletricidade, será dividida ou destinada à hidrólise, mesmo considerada a queima da lignina residual do processo de hidrólise (bagaço não hidrolisado) (MELO *et al.*, 2009).

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem como principal objetivo projetar um biorreator do tipo tambor rotativo para ser empregado no processo, em grande escala, de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Para isto foi necessário avaliar alguns parâmetros operacionais e de geometria utilizando um protótipo já existente no Laboratório de Engenharia Térmica e Fluidos (LETef).

1.2. Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi o estudo de um biorreator tipo tambor rotativo (protótipo) de 12 L de volume útil de modo a obter informações para o projeto, em maior escala, deste modelo de equipamento. Assim, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Projetar um biorreator tipo tambor rotativo com base em um protótipo já existente no laboratório.

- Estudar os parâmetros operacionais: velocidade de rotação do tambor e grau de enchimento do biorreator com o meio sólido interno.

- Validar o biorreator como um sistema eficiente para ser empregado no processo de hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica. Assim, neste trabalho foram realizados experimentos no biorreator, operado em regime batelada, com a enzima celulase (comercial), comparando seu desempenho em produção de glicose com resultados obtidos em frascos erlenmeyers e na literatura.

Revisão Bibliográfica

2.1. Processo de Produção do bioetanol

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos subprodutos gerado através da produção de etanol de primeira geração, após os procedimentos de limpeza, preparo e extração do caldo de cana. É a biomassa lignocelulósica mais numerosa e barata (MELO *et al.*, 2009).

Atualmente, o bagaço de cana-de-açúcar é usado para a cogeração fornecendo energia para o processo de produção de etanol. Estudos mostram a integração do uso do bagaço de cana para cogeração e para o bioetanol (OGEDA & PETRI, 2010).

De acordo com DIAS *et al.* (2012), uma vez que o bagaço de cana é usado como combustível em caldeiras para produção de energia na produção de bioetanol convencional, a quantidade de material lignocelulósico excedente utilizado como matéria-prima para a produção de bioetanol depende do consumo de energia dos processos de produção de bioetanol. É de fundamental importância para as usinas sucroalcooleiras reduzir o consumo de vapor no processo e aumentar a quantidade de material lignocelulósico em excesso melhorando significativamente a produção de etanol nas usinas.

Para a produção do bioetanol, a biomassa lignocelulósica é convertida em etanol, passando por várias etapas. Como primeira etapa, é necessário submeter o material lignocelulósico a um pré-tratamento, para disponibilizar a celulose ao ataque enzimático (SANTOS & GOUVEIA, 2009). Estes processos de pré-tratamento podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos, ou uma combinação destes, o que dependerá do grau de separação requerido para o produto subsequente (FERRAZ *et al.*, 2000). A etapa seguinte é a hidrólise (enzimática ou química), onde celulose é convertida em glicose. Na etapa de

hidrólise enzimática, a mistura de bagaço é transferida para o reator de hidrólise enzimática sob agitação até gerar a glicose. Como última etapa, o material gerado na hidrólise é fermentado e destilado para a fabricação do etanol. A Figura 1 apresenta o processo completo para produção do bioetanol, incluindo o processo de primeira e segunda geração (CARVALHO, 2011).

Figura 1: Fluxograma do processo para obtenção de bioetanol (DIAS *et al.*, 2012)

2.2. Composição química dos materiais lignocelulósicos

O material lignocelulósico estudado neste trabalho é o bagaço de cana-de-açúcar. Este é um dos mais abundantes complexos orgânicos de carbono na biomassa de planta e consiste principalmente de três componentes: celulose, hemicelulose e lignina. A Figura 2 mostra a composição do bagaço (CRUZ *et al.*, não publicado).

Figura 2: Composição do bagaço de cana-de-açúcar (CRUZ *et al.*, não publicado)

De acordo com a composição do bagaço, predomina a hemicelulose + celulose (sendo 17% de hemicelulose e 17% de celulose), seguida pela lignina. Não apresenta morfologia e tamanho uniforme de partículas, existindo diferenças significativas na densidade aparente apresentada por frações, tais como: casca, fibra e medula (MELO *et al.*, 2009). Basicamente a biomassa celulósica é composta de cadeias de celulose unidas entre si por ligações de hidrogênio. Essas longas fibras celulósicas são, por sua vez, recobertas por hemiceluloses e ligninas (PHLIPPIDIS *et al.*, 1993).

2.2.1. Celulose

A celulose é um polímero linear com ligações glicosídicas β -1,4 entre unidades D-glicopirranose. Tipicamente, cadeias de celulose em parede celular primária de plantas têm graus de polimerização (GP) na faixa de 5.000 a 7.500 unidades de monômero de glicose, o GP da madeira esta na faixa de 10.000 e 15.000 para o algodão (OGEDA & PETRI, 2010).

Celobiose é um dissacarídeo formado por duas unidades de glicose, formando uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água, envolvendo os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4 (CARVALHO, 2011).

Estudos sobre hidrólise consideram a existência da celulose nativa em duas formas, são elas amorfas e cristalinas. Na forma cristalina são na forma microfibrilas, conjunto paracristalinos de várias cadeias de ligações β -D glicosídica unidas por ligações de hidrogênio

intra e intermoleculares. A celulose é praticamente insolúvel em água e solventes comuns, devido as fortes ligações de hidrogênio (HON, 1996).

2.2.2. Hemicelulose

Hemicelulose, em geral, é classificada conforme o resíduo de açúcar, como por exemplo, xilanas, mananas e glucanas. São polissacarídeos ramificados formados principalmente, por D-xilose com pequenas quantidades de L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico e ácido manurônico. Hemiceluloses não são quimicamente homogêneas.

Diferentes unidades de açúcares são compostas por glicose, manose e galactose (hexoses) além da xilose e arabinose (pentoses), e podem apresentar variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses dependendo da planta. Na estrutura são similares à celulose e são depositadas na parede celular em um estágio anterior a lignificação. A estrutura possui ramificações e cadeias laterais que interagem com a celulose (RAMOS, 2003).

Em geral, as hemiceluloses estão quimicamente associadas a polissacarídeos, proteínas e ligninas e podem variar amplamente as espécies da composição química e as características estruturais (OGEDA & PETRI, 2010).

2.2.3. Lignina

Depois da celulose e hemicelulose, a lignina é a macromolécula mais abundante das matérias lignocelulósicas. São redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades fenilpropano interligadas. Conforme FENGEL & WENEGER (1989), a lignina age como material adesivo e também como barreira contra degradação enzimática.

É um polímero de estrutura polifenólica complexa, substância que age no crescimento do vegetal que são compostas de fenilpropano. Também são definidas como um material amorfo de estrutura tridimensional baseados nos alcoóis precumarílico, cniferílico e sinapílico (CARVALHO, 2011).

2.3. Hidrólise Enzimática

Uma das etapas para a obtenção do bioetanol é a hidrólise da celulose. Este processo pode ocorrer empregando um ácido ou enzima, sendo o produto final a conversão da celulose em glicose, que é posteriormente fermentada e destilada para a obtenção de etanol (O'DWYER *et al.*, 2006).

A hidrólise enzimática desses materiais é conduzida através de enzimas celulasas, que são altamente específicas. Celulasas são, usualmente, uma mistura de diversas enzimas. Os três maiores grupos de celulasas que estão envolvidas no processo de hidrólise são: endoglucanases; exoglucanases e betaglucosidase (SUN & CHENG, 2002).

Os processos de hidrólise são complexos devido a interações entre hemiceluloses e celulose, por essa razão, a biomassa necessita de um pré-tratamento para separar a matriz da lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar a hemicelulose separando o hidrolisado da celulose o qual sofre tratamento específico para obtenção da glicose (OGEDA & PETRI, 2010).

Para EKLUND *et al.*, (1990), a importância de, primeiramente, a biomassa ser tratada viabiliza aumentar a acessibilidade ao ataque enzimático, durante este processo a hemicelulose é hidrolisada com ácido diluído e a lignina é hidrolisada com tratamento básico. Em seguida, a celulose é quebrada pela ação das enzimas celulasas, o resultado é um alto rendimento de açúcares fermentescíveis. A desvantagem deste processo é que para atingir uma alta conversão da celulose são necessárias altas concentrações de enzima aumentando o custo desta produção. As variáveis de operação do processo de hidrólise são: temperatura, pH, concentração enzimática e a relação sólido-líquido (RABELO, 2010).

Na hidrólise enzimática, a transferência de massa ocorre das moléculas de enzima através da camada fina de filme líquido que cerca as partículas sólidas de celulose e ainda a difusão interna das moléculas de enzima na matriz sólida. A velocidade global desta reação pode ser influenciada por resistências e transferência de massa (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001). No processo de hidrólise enzimática do bagaço, há três etapas de transferência sendo estas: transferência de massa da enzima, adsorção da enzima na superfície do substrato e a catálise da celulase.

A velocidade global de reação depende da maior penetração da enzima e da difusão dentro do substrato sólido. Não ignorando a resistência à transferência de massa externa e interna, se faz um ciclo dinâmico da enzima: difusão – adsorção – catálise – dessorção – difusão. Durante este processo, barreiras de transferência poderia transformar-se em um fator significativo na determinação da taxa da reação. Além disso, a inibição da enzima depende da concentração de celobiose e glicose no meio, dependendo da transferência de massa dentro do reator (GAN *et al.*, 2003).

2.4. Biorreatores

O biorreator é considerado o coração de um bioprocesso, sendo este utilizado para executar uma ou mais reações bioquímicas, convertendo matérias-primas em produtos. A conversão ocorre através da ação de biocatalisadores – enzimas, microrganismos, células animais e vegetais, estruturas subcelulares como cloroplastos e mitocôndrias (CHISTI & MOO-YOUNG, 2002).

Os biorreatores são empregados em processos biotecnológicos para o controle e monitoramento dos principais parâmetros operacionais (temperatura, pH, agitação e aeração) (SCHÜGERL, 1987). A agitação que ocorre nos biorreatores tem a função de manter a homogeneidade do meio reacional, remover os gases e o calor gerado durante o experimento (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

Na literatura é possível encontrar vários modelos de biorreatores para a produção de etanol, como os do tipo agitados mecanicamente (AIBA *et al.*, 1968; HOJO *et al.*, 1999; LÜBBEHÜSEN *et al.*, 2004; SCHELL *et al.*, 2004; ALFENORE *et al.*, 2002 e 2004), os não-agitados mecanicamente (ROBLE *et al.*, 2003; ANDRIETTA *et al.*, 2008); os do tipo leito fluidizado com células imobilizadas (NAGASHIMA *et al.*, 1984; ROBLE *et al.*, 2003; KOURKOUTAS *et al.*, 2004; BRÁNYIK *et al.*, 2005; VERBELEN *et al.*, 2006) e os de membrana (LEE & CHANG, 1987). Alguns modelos de biorreatores de fermentação semi-sólida foram estudados por NAGEL *et al.*, 2000; POLIDORO, 2009; LIMA, 2009; FERNÁNDEZ, 2009; MARQUES, 2005. Os biorreatores também podem operar com diferentes matérias-primas, entre elas as derivadas de resíduos industriais como palha de milho, bagaço de cana, etc. (SIQUEIRA *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009). Contudo, quando se trata do processo de hidrólise, principalmente a enzimática, de uma biomassa lignocelulósica, os trabalhos com biorreatores, tanto em escala laboratorial como industrial,

são inexistentes. Há trabalhos realizados com biorreatores em escala de bancada (PEREIRA *et al.*, 2010) mas são pouco estudados, isto ocorre devido à dificuldade de agitação e mistura da biomassa, na maioria os trabalhos científicos utilizam frascos erlenmeyers montados em shaker (ou mesas) rotativas (SANTOS & GOUVEIA, 2009; CARVALHO, 2011; OGEDA & PETRI, 2010; DIAS, *et al.*, 2012; O'DWYER, *et al.*, 2006).

2.4.1. Classificação dos biorreatores

Os biorreatores podem ser classificados em dois grandes grupos. No primeiro grupo, são biorreatores nos quais as reações ocorrem na ausência de células vivas, ou seja, são tipicamente os “reatores enzimáticos”. No segundo grupo, as reações se processam na presença de células vivas (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

Nestes dois grandes grupos, há outras classificações que dependem de outros fatores como o tipo de biocatalisador, a configuração do biocatalisador e quanto à forma de agitação do meio reacional (CHISTI, 2002). Os dois grupos distintos de biorreatores são: biorreatores em fase aquosa, ou fermentação submersa, biorreatores em fase não aquosa, ou fermentação semi-sólida. (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

2.5. Biorreatores em fase aquosa – fermentação submersa

Os biorreatores classificados em fase aquosa são subdivididos em células ou enzimas livres, células ou enzimas imobilizadas em suportes e ainda células ou enzimas confinadas entre membranas (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001). A Figura 3 apresenta estes tipos de biorreatores.

Figura 3: Classificação dos biorreatores em fase aquosa – fermentação submersa: (a) STR, (b) coluna de bolhas, (c) “air-lift”, (d) “plug-flow”, (e) com células imobilizadas (leito fixo), (f) com células imobilizadas (leito fluidizado), (g) reator com membranas planas, (h) fibra oca ou “hollow-fiber” (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

No primeiro caso estão os biorreatores que usam células ou enzimas livres - dentre eles estão os reatores agitados mecanicamente (chamado de *STR* – *Stirred tank reactor*), os reatores agitados pneumaticamente e os reatores de fluxo pistonado (OJEDA, 2009).

Os biorreatores mais empregados são os agitados mecanicamente (*SRT*) indicado na Figura 3(a) também conhecidos como reatores de mistura ou tanque agitado, devido sua versatilidade, são considerados um modelo de referência para indústria de processos (OJEDA, 2009). Sua forma de construção é de um tanque cilíndrico, normalmente equipado com chicanas ou aletas, dispositivo que impede a livre circulação de um fluído ou de um sólido, e evita a formação de movimentos espirais ao redor do centro do tanque durante a agitação do líquido. O agitador é montado no eixo central do tanque e possui uma série de turbinas ao longo de sua altura (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001). Nesses fermentadores, a energia é transmitida ao fluido, principalmente, através dos agitadores e, portanto, o consumo de energia durante a agitação deve-se, quase na sua totalidade, à resistência que o caldo exerce

sobre as pás dos agitadores quando esses são rotacionados. As desvantagens desse modelo, especialmente em processos de grande escala, são: alto consumo de energia, elevada complexidade de construção e dificuldades no aumento de escala (ONKEN *et al.*, 1983).

Ainda que os biorreatores do tipo agitados mecanicamente sejam os mais empregados em escala industrial, há outros equipamentos que podem ser empregados no processo de hidrólise enzimática de uma biomassa lignocelulósica, como os biorreatores coluna de bolhas, considerado um reator agitado pneumaticamente. Este equipamento não possui o impelidor mecânico movimentando o meio, assim a agitação do líquido é feita pelo borbulhamento de um gás (normalmente ar) dentro do tambor cilíndrico. Este tipo de reator apresenta algumas vantagens se comparado ao reator do tipo *STR* com agitação mecânica, seu baixo custo inicial, configuração simples e custo operacional reduzido (PINHEIRO, 2007). Ainda dentro da linha de reatores pneumáticos há os biorreatores “air-lift”. Existe uma pequena diferença entre os reatores coluna de bolhas e os reatores “air-lift”, para “air-lift” existe uma movimentação cíclica do fluido através de dispositivos e arranjos internos e nos reatores de bolhas o movimento do líquido é aleatório, nas Figura 3(b) e 3 (c) ilustram-se esquematicamente esses dois tipos de reatores (OLIVEIRA, 2010).

No segundo caso estão os reatores que usam células ou enzimas imobilizadas em suportes – dentre eles estão os reatores de leito fixo, reatores de leito fluidizado entre outros. Exemplos destes tipos de biorreatores estão na Figura 3 (e) e 3 (f).

No terceiro caso, estão os reatores que usam células ou enzimas confinadas entre membranas – são eles os reatores com membranas planas e os de fibra oca conforme Figura 3 (g) e 3 (h).

2.6. Biorreatores em fase não aquosa – fermentação semi-sólida

Os biorreatores em fase não aquosa, empregados para processos de fermentação semi-sólida, caracterizam-se pela ausência de “água livre”. Neste caso, é necessário controlar as condições de operação e condições ambientais. Os biorreatores em fase não aquosa são divididos em quatro grupos: com aeração superficial e sem agitação (grupo dos biorreatores com bandejas) com aeração forçada e sem agitação (grupo dos biorreatores de leito empacotado); com aeração superficial e agitação (grupo dos biorreatores tambor rotativo) e

com aeração forçada e agitação (grupo com variedade de parâmetros). Na Figura 4 são esquematizados estes quatro grupos (MITCHELL *et al.*, 2006).

Figura 4: Classificação dos biorreatores em fase não aquosa – fermentação em estado sólido (MITCHELL *et al.*, 2006).

2.6.1 Biorreatores com aeração superficial e sem agitação

Este grupo é conhecido como reatores de bandejas (*stationary trays*), ainda é muito limitado em relação às condições de transferência de oxigênio e controle das condições ambientais (LAUKEVICS *et al.*, 1984). Estes equipamentos são compostos por bandejas de fundo inteiriço em madeira, aço ou materiais poliméricos ou fundo perfurado. Os biorreatores com fundo perfurado possibilitam maior contato do substrato na fase gasosa. Dispostos em salas climatizadas e ventiladas, estufas de bancada ou em bandejas individuais, circulação de ar natural ou forçada, passando por umidificadores. Também podem ser utilizados sacos plásticos com fechamento vedado dispostos em estufas ou salas climatizadas (OLIVEIRA, 2010).

O conceito de aeração superficial é a passagem do fluxo gasoso pela superfície do substrato sólido, para o caso de aeração forçada é a passagem do fluxo através do substrato sólido. A Figura 5 mostra alguns modelos de biorreatores de bandeja (MITCHELL *et al.*, 2006).

Figura 5: Biorreatores com aeração superficial sem agitação. (a) câmara climatizada; (b) estufa; (c) bandeja individual; (d) saco plástico (MITCHELL *et al.*, 2006).

2.6.2 Biorreatores com aeração forçada e sem agitação

Este grupo de biorreatores é denominado de biorreatores de leito empacotado, ou biorreatores leito fixo. Nestes equipamentos, o biocatalisador está imobilizado em uma região permanecendo estacionário, e a solução do substrato circula através desta região (VITOLO, 2001). Na Figura 6 são apresentadas quatro variações deste tipo de biorreatores, sendo que na Figura 6 (a) apresenta o biorreator de leito empacotado clássico, com formato tubular e fluxo ascendente de ar que atravessa o meio de cultivo; Figura 6 (b) biorreator de leito empacotado com duto central, o ar tende a fazer caminhos preferenciais no eixo central; Figura 6 (c) biorreator de leito empacotado com fluxo radial, o ar só tem um caminho que é atravessando o meio de cultivo na região central para fora; Figura 6 (d) biorreator de leito empacotado chamado de *short-wide*, combina bandeja com aeração forçada, o uso da bandeja com fundo perfurado, faz com que o fluxo de ar atravesse a camada de substrato (MITCHELL *et al.*, 2006).

Figura 6: Biorreatores com aeração forçada e sem agitação. (a) biorreator de leito empacotado; (b) biorretor de leito empacotado com duto central; (c) biorreator de leito empacotado com fluxo radial; (d) biorreator short-wide (MITCHELL *et al.*, 2006).

2.6.3 Biorreatores com aeração forçada e com agitação

Este é o grupo com maior alternativa de parâmetros de controle de processo fermentativo: temperatura, teor de umidade e fluxo do ar injetado, intensidade de mistura e facilidade de adição de água e outros aditivos ao processo (MITCHELL *et al.*, 2006). Basicamente, a característica deste tipo de biorreator é a introdução de ar através de uma peneira que suporta o substrato que se encontra estático durante ou na maior parte da fermentação (DURAND & CHEREAU, 1988).

Na Figura 7 é apresentada quatro variações de modelos deste grupo: biorreator de coluna com agitação mecânica do leito, Figura 7 (a), digamos que é uma evolução do sistema de leito empacotado; tambor agitado com parede inferior perfurada, Figura 7 (b), neste caso tem um melhor contato do ar com o meio; biorreator de tambor rotativo com injeção de ar no interior do meio, Figura 7 (c), mesmo princípio da Figura 7 (b) e biorreator de leito fluidizado, Figura 7 (d), onde a agitação é feita pelo fluxo de ar no interior.

Figura 7: Biorreatores com aeração forçada e agitação. (a) leito agitado; (b) tambor agitado; (c) tambor rotativo; (d) leito fluidizado (MITCHELL *et al.*, 2006)

Os biorreatores de leito fluidizado gás-sólido possuem passagem de ar ou gás inerte através de um leito de partículas sólidas, onde a vazão é suficientemente elevada. Possui vantagem de melhorar as condições de transferência de massa no sistema e controlar a temperatura (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001). Diferente do reator de leito fixo, a enzima encontra-se em suspensão dentro do reator, sendo a solução de substrato é bombeado através dela. A velocidade de fluxo da solução de substrato faz com que as partículas do fundo não se depositem e ao mesmo tempo não são arrastadas no efluente (MELLMANN, 2001).

É também utilizado para aplicação de Fermentação em Estado Sólido (FES) pois torna possível a manipulação interna do equipamento e variáveis operações das quais favorecem os processos fermentativos, é possível avaliar a movimentação do meio interno, a molhabilidade do leito e o comportamento térmico do reator frente as diferentes condições de operação (AGUDELO, 2010).

2.6.4 Biorreatores com aeração superficial e com agitação

Este grupo é conhecido como tambores rotativos conforme (*rotating drum bioreactor, RDBs*) (Figura 8(a)), no qual a rotação do cilindro permite exposição total do meio ao fluxo. Uma variação neste modelo de equipamento apresenta agitação central feita por pás que giram no interior do tambor estático, conforme Figura 8(b) (MITCHELL *et al.*, 2006). Em geral são amplamente utilizados nas indústrias químicas e de processo como misturadores, secadores, moinhos e reatores para o processamento de materiais granulares (SANTOMASO *et al.*, 2004).

Figura 8: Biorreatores com aeração superficial e agitação. (a) Biorreator de tambor rotativo; (b) Biorreator de tambor agitado (MITCHELL *et al.*, 2006).

2.7 Vantagens e desvantagens entre biorreatores de fermentação submersa e biorreatores de fermentação semi-sólida

Comparando os dois grupos, tem-se as vantagens em se utilizar os biorreatores de fermentação semi-sólida pelos seguintes aspectos (DOELLE *et al.*, 1992):

- Meio de cultivo simples, geralmente subprodutos agrícolas que apresentem alto teor de nutrientes;
- Devido a baixa atividade de água, impede contaminações;
- A aeração forçada é facilitada pela porosidade do suporte, permitindo alta transferência de ar.

Como desvantagens temos:

- As aplicações são em geral mais limitadas a microorganismo que crescem a baixos teores de umidade;
- A natureza sólida do substrato pode dificultar a medição de parâmetros de fermentação, tais como pH, temperatura, umidade e concentrações de substratos e produtos;
- Maior tempo no processo de fermentação, pois são usados geralmente microorganismos que apresentam baixas velocidades específicas de crescimento.

2.8 Biorreator do tipo tambor rotativo

O destaque dado a este tipo de biorreator é devido à escolha do modelo para este trabalho. O uso das chicanas ou aletas no interior do cilindro tem função de melhorar a mistura do meio, outras variações deste modelo podem ter paredes perfuradas duplas ou inclinadas. Tem o potencial de fornecer razoável transferência de calor com misturas suaves é também utilizado para o estado sólido de fermentação onde proporciona a difusão de oxigênio no interior do meio de cultivo e dissipação do calor e dos gases vindos do metabolismo microbiano, isto favorece o crescimento e formação de produto (MITCHELL *et al.*, 2006).

Outra função das aletas é melhorar a movimentação radial das partículas e também a mistura, principalmente quando existe uma condição de queda de fluxo da mistura, também evitar a formação de vórtice durante a agitação do líquido (SCHMIDELL & FACCIOITI, 2001). Algumas características básicas, como a inclusão das aletas, reversão periódica da

direção de rotação e inclinação do tambor na axial para horizontal e inclinação do cilindro são apresentadas na Figura 8 (a).

A diferença entre os biorreatores tambores rotativos e os biorreatores com agitação é que no tambor rotativo o corpo do tambor é revolvido para agitar o leito, no tambor agitado o corpo do tambor permanece estático e o leito é misturado pelo agitador (MARQUES, 2005). Estes biorreatores podem facilmente serem adaptados para operações contínuas, podendo até aumentar a produtividade em grande escala.

A forma de construção é basicamente um cilindro horizontal cujo interior é preenchido parcialmente com substrato sólido e a aeração realizada na parte superior ao leito dentro do biorreator. A agitação é controlada e favorece a transferência de massa e calor dentro do cilindro permitindo a distribuição uniforme dos nutrientes adicionados durante o processo. A agitação não deve ser excessiva, levando em conta o tipo de substrato ou organismo que será colocado no tambor (LIMA, 2009).

Alguns tipos de tambores rotativos, se assemelham a secadores de tambor rotativo, empregados com frequência na secagem de materiais particulados, como o açúcar. Neste tipo, o tambor gira com baixa rotação, o ar preferivelmente saturado percola longitudinalmente o tambor, resultando uma grande homogeneidade térmica. Para operações em maiores escalas, utiliza-se o resfriamento evaporativo, removendo calor do leito durante a geração de calor (RANI *et al.*, 2009).

Apesar da redução dos elementos que são colocados no interior do leito, em comparação com as bandejas, muitas culturas de fungos demoram para se desenvolverem adequadamente devido às forças de cisalhamento (PANDEY *et al.*, 2001). Ficando restrito o uso deste biorreatores para microorganismo que tolerem agitação contínua.

2.9. Movimentação das partículas em biorreatores do tipo tambor rotativo

A importância de se conhecer o padrão de movimentação das partículas sólidas no interior de biorreatores do tipo tambor rotativo está relacionada com uma das dificuldades em se operar um reator em Estado Sólido (ES), a remoção do calor metabólico gerado pela reação. Com o aumento da temperatura no biorreator, as reações químicas e enzimática

passam a ocorrer com maior velocidade, porém é necessário saber o limite de temperatura pois determinados sólidos podem desnaturar de forma irreversível, ocasionando danos à cultura (XAVIER *et al.*, 2009).

O parâmetro, movimentação das partículas sólidas, está diretamente relacionado ao grau de enchimento do tambor. O conhecimento da mistura permite prever a quantidade de água e a rotação do tambor necessária à boa molhabilidade do meio poroso, estando fixas a geometria do sistema (com a existência ou não de elementos internos), o tipo de recheio e o grau de enchimento do cilindro (XAVIER *et al.*, 2009).

Os sólidos podem ser considerados nas direções radiais e axiais. O fluxo radial dentro do leito é importante porque afeta a transferência de calor e massa entre o leito e o meio interno do tambor bem como a homogeneidade do leito. O fluxo de transporte axial não têm influência sobre o movimento transversal. Nos experimentos de mistura são observados os movimentos transversais ou longitudinais (SANTOMASSO *et al.*, 2004; MELLMANN, 2001).

Alguns parâmetros considerados no projeto de biorreatores são: o controle de temperatura, pH e atividade de umidade. Nos estágios iniciais do metabolismo microbiano, as condições de temperatura e concentração de oxigênio são em geral, homogêneas ao longo do leito (POLIDORO, 2009).

Outro fator considerado é o pH local, em alguns casos, pode-se adicionar solução-tampão ao substrato, porém depende da escolha do modelo do biorreator (SCHEPER *et al.*, 2000). Para a enzima utilizada neste trabalho o fabricante especifica a temperatura de 50 a 65°C e pH entre 4,0 e 5,0.

MELLMANN (2001) propõe um estudo completo do movimento das partículas bem como sua agitação, sendo um fator relevante para o projeto do biorreator. A Tabela 1 mostra todas as formas de movimentação do tambor rotativo.

Tabela 1: Formas de movimentação transversal do tambor rotativo (MELLMANN, 2001).

Formas básicas	Escorregamento		Cascadeamento			Catarata	
Subformas	Deslizamento	Surgimento	Intermitente	Rolante	Cascadeante	Catarata	Centrifugando
Esquema:							
Processo físico	Deslizamento		Misturando			Esmagando	Centrifugando
Número de Froud (Fr)	$0 < Fr < 10^{-4}$		$10^{-5} < Fr < 10^{-3}$	$10^{-4} < Fr < 10^{-1}$	$10^{-3} < Fr < 10^{-1}$	$0,1 < Fr < 1$	$Fr \geq 1$
Grau de enchimento	$f < 0,1$	$f > 0,1$	$f > 0,1$	$f > 0,1$		$f > 0,2$	
Coef. Grau enchimento	$\mu_{lw} < \mu_{lw,c}$	$\mu_{lw} \geq \mu_{lw,c}$	$\mu_{lw} > \mu_{lw}$			$\mu_{lw} > \mu_{lw,c}$	
Aplicação	Não usado		Fornos rotativos, reatores, secadores rotacionados, <i>coolers</i> , tambores de mistura			Moinhos de bolas	Não usado

No regime de escoamento, o escorregamento ocorre devido à condição desfavorável de atrito entre o sólido e a parede do cilindro onde se torna impossível vencer as forças gravitacionais (Tabela 1), se divide em deslizamento e surgimento. Nesta situação, não há mistura visível entre as partículas e o recomendado é utilizar chicanas ou aletas para melhor movimentação das partículas (XAVIER *et al.*, 2009). O deslizamento ocorre quando a parede do cilindro é muito lisa. Durante o giro do tambor, o movimento se torna permanente, devido à alta velocidade rotacional e grau de enchimento. Com a diminuição do atrito da parede, o movimento muda para surgimento, caracterizado por uma alternância entre atrito adesivo e cinético na parede do tambor. A partícula sólida adere na parede mais alta fazendo um ângulo de deflexão e desliza pela superfície da parede (REUTER, 1975).

Para o regime de escoamento do tipo cascadeamento, as partículas adjacentes à superfície livre do leito ganham energia para circular continuamente. É subdividida em intermitente, rolante e cascadeante, conforme (Tabela 1). No caso de Intermitente, a velocidade de rotação é mais baixa fazendo o leito elevar-se continuamente até que uma pequena avalanche de sólidos ocorre e o leito se desliza para uma posição próxima do repouso (XAVIER *et al.*, 2009). Na subdivisão Rolante, é caracterizado por partículas em movimento

uniforme e um corpo sólido estacionário. A superfície do leito é em “quase nível” e o ângulo de repouso dinâmico aparece apenas levemente dependendo da velocidade rotacional e grau de preenchimento. Devido à agitação, as partículas têm boa mistura, sendo este regime ideal para aplicação em indústrias, como fornos, reatores rotativos e tambores de mistura (MELLMANN, 1989; BLUMBERG, 1995). Conforme o aumento da velocidade rotacional, a superfície do leito começa arquear. Este é um regime de escoamento que promove a boa mistura dos sólidos e é chamado de cascadeante (XAVIER *et al*, 2009).

Ao elevar a velocidade rotacional, surge a forma catarata, que se caracteriza pelo arremesso de partículas no meio livre, fazendo elevar a força centrífuga (MELLMANN, 2001). No caso de acréscimo na velocidade, partículas começam a aderir na parede e, em casos, extremos ocorre a centrifugação. Normalmente, a centrifugação ocorre no final do estágio, quando todo material está em contato com a parede do cilindro fazendo um filme uniforme, mas isto ocorre apenas em altíssimas velocidades (DIEDRICH, 1961).

2.10. Variações de projeto e operação para biorreator tambor rotativo

Algumas variações no projeto destes tipos de biorreatores são: comprimento e diâmetro do equipamento, inclinação do centro axial para a horizontal, tamanho das aletas, entrada e saída do sistema de aeração, presença ou ausência de camisas de resfriamento e temperatura interna, conforme Figura 9. Já as variações no processo são: velocidade de rotação; fração de volume ocupado pelo leito; temperatura, umidade e vazão do ar de entrada e adição de água no leito (LIMA, 2009; MITCHELL *et al.*, 2006).

Figura 9: Variação de projeto e operação das variações do tambor rotativo (MITCHELL *et al.*, 2006).

Algumas destas operações podem ser alteradas durante o funcionamento. A variação do projeto e operação pode influenciar diretamente no desempenho do biorreator tipo tambor rotativo que dependerá da eficácia da troca de água e energia entre o leito e o meio (parte interna). A efetividade desta troca será afetada pelos padrões de fluxo dentro do leito e do meio (MELLMANN, 2001).

Os parâmetros de comprimento e inclinação do cilindro são determinados pelo transporte axial, e não tem influência no movimento transversal, então são feitos estudos

experimentais no movimento transversal e podem ser realizada em batelada e na horizontal (MELLMANN, 2001).

MITCHELL *et al.*, (2006) fizeram um estudo de comparação com o uso e ausência de aletas nos biorreatores. Neste estudo também foi comparado o uso de aletas curvas, que possibilitou uma melhora na mistura nos sentidos axiais e radiais. Ao utilizar as aletas internas, os autores verificaram que ao inclinar o eixo do cilindro em relação a horizontal, o meio com sólidos apresentavam uma boa mistura e ainda um caimento no sentido da inclinação, Figura 10.

Figura 10: a) Uso de aletas angulares internas e inclinação do eixo do cilindro promovendo mistura axial para uso em reatores tambores rotativos b) Ângulo dinâmico de repouso para agitação do leito, representando um limite superior para a inclinação do eixo do tambor que deve ser usado (MITCHELL *et al.*, 2006).

Um processo ideal deveria envolver um número mínimo de etapas, ser um processo simples e rápido com mínimo custo de investimento em equipamentos e mínimo custo de operação, gerar o mínimo possível de efluentes e resíduos e por fim, ser um processo seguro do ponto de vista socioeconômico e ambiental (SANTOS *et al.*, 2006).

2.11. Critérios para seleção do Biorreator

A escolha do biorreator depende do processo no qual este será empregado, bem como o substrato e o biocatalisador que serão utilizados para o desenvolvimento deste. O foco deste trabalho foi o estudo do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Como o interesse do estudo é utilizar altas cargas de sólidos, acima de 5 % (p/v), biorreatores

convencionais, com eixos mecânicos para a movimentação do meio, como os tanque agitados, não são adequados ao processo devido ao gasto de energia necessário para girar o eixo.

A agitação é um fator de grande importância na seleção de um biorreator, pois possibilita a transferência de calor e massa entre as fases, além de promover a homogeneidade do meio reacional (SANTOS, 2006).

Fundamentos Teóricos

Neste capítulo serão descritos os principais tópicos para a avaliação do reator tipo tambor rotativo que de acordo com todas as análises foi o escolhido para o projeto.

3.1. Cálculo do número Froud (Fr)

Como mencionado anteriormente, as formas básicas dos regimes de escoamento para um reator tambor rotativo são: escorregamento, cascadeamento e catarata. Para delimitar os tipos de movimentação são necessários: grau de enchimento (f), a fração da seção transversal do cilindro que esta preenchida com o material granular e número de Froud (Fr) (MELLMANN, 2001). O parâmetro ($\mu_{w,c}$) é o coeficiente de atrito da parede.

$$Fr = \frac{\omega^2 R}{g} \quad (1)$$

Onde:

ω – velocidade angular do tambor; R – raio do tambor; g – aceleração da gravidade.

A velocidade angular (ω) se calcula por meio da frequência ou velocidade de rotação,

F.

$$\omega = 2\pi F \quad (2)$$

3.2. Cálculo do grau de enchimento (f)

O grau de enchimento (f) é definido como a razão entre a seção transversal do cilindro ocupada pelas partículas e o cilindro (Eq. 3) (MELLMANN, 2001) (Figura 11).

Figura 11: Diagrama esquemático da seção transversal do cilindro.

Então a equação segue (XAVIER *et al.*, 2009):

$$f = \frac{\text{segmento circular} - \text{área do triângulo}}{\text{área do cilindro}} \quad (3)$$

$$f = \frac{\frac{1}{2}R^2(2\varepsilon) - r \frac{S}{2}}{\pi R^2} \quad (4)$$

Onde:

f = grau de enchimento; R = raio interno do tambor; ε = ângulo central do segmento circular ocupado pelo material (grau) por dois; r = comprimento do centro até o segmento circular, formando um ângulo reto; S = comprimento do segmento circular.

O comprimento do segmento circular do cilindro (S) (Eq. 5) define a trajetória linear que cada partícula descreve:

$$S = 2R \cdot \text{sen}(\varepsilon) \quad (5)$$

O ângulo de enchimento corresponde a metade do ângulo do leito no segmento circular ocupado pelo sólido.

3.3. Cálculo da velocidade crítica (N_c)

O regime de fluxo depende de vários fatores, incluindo a taxa de rotação e a porcentagem de enchimento do tambor. Pode-se relacionar os regimes de escoamento de frações da velocidade crítica de rotação (N_c) que é definida como a velocidade onde as partículas são mantidas contra o interior da parede do tambor, sob ação centrífuga (MITCHELL *et al.*, 2006) (Eq. 6).

$$N_c = \frac{42,3}{\sqrt{D}} \quad (6)$$

Sendo, N_c a velocidade crítica rotacional; D o diâmetro do tambor.

No estado que o tambor tem velocidade de 0 rpm, parado, ou girando, não tem nenhuma ação de movimento no leito. No regime de escoamento de deslizamento e intermitente ocorre uma rotação de menos que 10% da velocidade crítica, então o leito se move inteiro. Isso significa que a quantidade de mistura dentro do leito é insignificante (MITCHELL *et al.*, 2006).

Materiais e Métodos

Neste capítulo são descritos os materiais e metodologias empregados neste trabalho. Primeiramente são apresentados os materiais utilizados durante a pesquisa: bagaço de cana-de-açúcar, enzima e equipamentos. Em seguida, são descritas as metodologias analíticas necessárias para o desenvolvimento do trabalho.

4.1. Biomassa

Para a realização dos experimentos, utilizou-se o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (*Saccharum officinarum*). Este bagaço é proveniente da colheita (2011/2012) e fornecido pelo Grupo Raízen (São Paulo, Brasil). Antes dos experimentos, o bagaço de cana foi seco a 45 °C durante 48 horas e deixada a temperatura ambiente durante 24 horas e, em seguida, armazenados em recipientes de plástico à temperatura ambiente até ser usado.

4.2. Enzima Celulase

A enzima utilizada no processo de hidrólise do bagaço de cana de açúcar é a enzima comercial Accellerase 1500® (Danisco) gentilmente doada para a realização dos experimentos. De acordo com fabricante, esse complexo possui melhor estabilidade operacional se utilizar a uma faixa de temperatura de 50 a 65°C e numa faixa de pH de 4,0 a 5,0. Para efeitos de ensaios prolongados, considera-se que a temperatura de 50 °C é a melhor escolha já que em temperaturas mais altas pode ocorrer a inativação da enzima.

4.3. Equipamentos

Os Equipamentos utilizados neste trabalho estão relacionados na Tabela 2:

Tabela 2: Equipamentos utilizados para experimentos laboratoriais

Equipamento	Marca	Modelo
Balança de alta precisão	METTLER TOLEDO	XP 10003S COMPARATOR
Autoclave	PHOENIX LUFERCO	Autoclave vertical linha AV
Phmetro de bancada	TECNAL	TEC - 5
Estufa para secagem	STERILIFER	SX 1.3 DTME
Shaker Rotativo	INFORS HT MINITRON	AGCH-4103 BOTTMINGEN
Biospectro	ESPECTROFOTOMETRO	SP-22

4.4. Protótipo do biorreator tipo tambor rotativo

O biorreator empregado neste trabalho foi do tipo tambor rotativo com volume útil de 12L, já existente no Laboratório de Engenharia Térmica e Fluidos (LETef). Este equipamento é composto de 4 aletas internas ao longo do comprimento do tambor para uma melhor mistura. O protótipo apresenta trocador de calor instalado na parte externa do tambor e sensores de temperatura.

Figura 12: Representação esquemática do protótipo do biorreator tambor rotativo já existente e utilizada nos experimentos com bagaço de cana-de-açúcar.

4.5. Unidade experimental montada para realização dos experimentos

Na Figura 13 é apresentado o esquema da unidade experimental montada para a realização dos experimentos (PEREIRA, 2013). Esta unidade é composta pelos seguintes componentes: 1 – reator; 2 – bomba; 3 – trocador de calor (cilindro externo do reator); 4 – módulo de aquisição de dados; 5 – computador; 6 - inversor de frequência; 7 – motor; 8- resistência para aquecimento água ou ar; 9 a 11 – sensores de temperatura; 12 e 13 – relês eletrônicos.

Figura 13: Representação esquemática do sistema para operação do biorreator tambor rotativo

4.6. Metodologia

4.6.1. Determinação da atividade Total das Celulases

Para determinar a atividade celulósica das enzimas foi utilizado o método de açúcares redutores totais (ART). Para quantificação dos açúcares totais (AR) foi construída uma curva padrão de glicose usando valores absolutos de glicose (mg/0,5mL) vs. absorbância (CARVALHO, 2011). No trabalho apresentado por GHOSE (1959), o autor obteve a concentração das enzimas através da equação (7):

$$\text{Concentração} = \frac{1}{\text{Diluição}} = \frac{\text{volume de enzima na diluição}}{\text{volume total de diluição}} \quad (7)$$

A concentração de enzima foi estimada para produzir 2,0 mg de glicose, plotando em um gráfico semi-logarítmico glicose liberada versus concentração de enzima. Em seguida, com valor de concentração de enzima obtido, calcularam-se as unidades da seguinte maneira (Equação.8).

$$FPU = \frac{0,37}{\text{Concentração de enzima que realiza 2,0 mg de glicose}} \cdot (\text{unidade mL}^{-1}) \quad (8)$$

Onde:

1 UI = 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de substrato convertido

1 UI = 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de glicose (açúcar redutor como glicose) convertido

1 UI = 0,18 $\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$ quando o produto é glicose

A quantidade absoluta de glicose utilizada para os cálculos é 2,0 mg então 2,0/0,18 μmol . Esta quantidade de glicose foi produzida por 0,5 mL de enzima em 60 min. Então:

$$2 \text{ mg glicose} = 2 / (0,18 \times 0,5 \times 60 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}) = 0,37 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} (\text{UI mL}^{-1})$$

4.6.2. Quantificação de Glicose

Para a determinação de glicose liberada durante o processo de hidrólise do bagaço foi utilizada kit enzimático contendo um reagente pronto para o uso e também uma solução

padrão de glicose 100 mg.dL⁻¹. De acordo com o fabricante, ao adicionar glicose no reativo que é composto por uma solução tampão de fosfatos, contando p-Hidrozi benzoato, 4-Aminoantipirina (4-AAP), Glicose Oxidase (GOD) e peroxidase (POD), processam-se as seguintes reações:

O método baseia-se na oxidação enzimática da glicose através da enzima Glicose Oxidase (GOD), resultando em ácido Glucônico e peróxido de hidrogênio. Este é somado a 4-Aminoantipirina (4AAP) em contato com a enzima Peroxidase formando 4-antipirilquinonimina e 4 moléculas de água. O produto formado (4-antipirilquinonimina) pela oxidação de 4-AAP é de coloração rosa e intensidade diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. A cor rósea obtida pela reação, é medida em espectrofotômetro com absorção máxima de 540 nm. Para a quantificação de glicose, adicionou-se 30 µL de cada uma das amostras em eppendorfs já identificados e 3,0 mL de reativo. Permaneceram as amostras em banho termostático a 37°C por 10 minutos para desenvolvimento da coloração. Após este tempo, leu-se no espectrofotômetro em 540 nm. Para as amostras que equivalem ao branco, adicionou-se 30 µL de solução tampão citrato 50mM a pH 4,8, juntamente com as amostras, foi possível construir uma curva de calibração de glicose, onde inicialmente preparou-se uma solução mãe de glicose (10 mg.mL⁻¹) . Após este procedimento é possível construir a curva de calibração de glicose mg.mL⁻¹ vs absorbância, pela equação da reta, calcularam-se os valores de glicose de cada amostra.

4.6.3. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Para a realização do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar, foi necessária, primeiramente, a etapa de pré-tratamento.

Inicialmente, o bagaço de cana foi tratado quimicamente com o objetivo de solubilizar a hemicelulose. Assim, neste caso foi utilizada uma razão de sólido-líquido (1:16 gramas de bagaço seco/mL de solução a 1% H₂SO₄). Em seguida, as amostras foram autoclavadas durante 30 min, a 1 atm e 120 °C. Após esta etapa, as amostras foram lavadas com água destilada até a neutralização do pH (pH 7,0) e conduzidas à estufa para secagem durante 24 horas, à temperatura de 60°C.

Posteriormente, seguiu-se para a próxima etapa onde, o bagaço foi tratado com solução alcalina NaOH a 1% (p/v) com o intuito de promover a deslignificação. A suspensão, contendo bagaço de cana, também foi autoclavada e após este processo, as amostras foram lavadas abundantemente com água destilada para eliminar o excesso de solução alcalina, até atingir um pH neutro (REZENDE *et al.*, 2011). Após o processo de pré-tratamento, o bagaço de cana-de-açúcar seco em estufa durante 24 horas à temperatura de 60°C e triturado de forma a obter um tamanho proporcional a ≤ 5 cm..

4.6.4. Hidrólise enzimática em frascos erlenmeyers e em biorreator tambor rotativo

Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados em frascos erlenmeyer (controle) e no protótipo biorreator tambor rotativo. Nestes experimentos utilizou-se bagaço *in natura* e pré-tratado quimicamente com H₂SO₄ 1% e NaOH 1%.

Os experimentos realizados em frascos erlenmeyers de 500 mL, em triplicada, com concentração de 100 g/L de bagaço em solução tampão citrato 50mM a pH 4,8, volume total líquido de 50 mL e preparação comercial da enzima de 7 e 15 FPU/g de bagaço seco. Os experimentos foram realizados em shaker com velocidade de 150 rpm e temperatura de 50°C. Para o bagaço pré-tratado com H₂SO₄ 1% e NaOH 1%, repetiu-se o procedimento para o bagaço *in natura*. Após finalização dos dados foi feito um novo teste com uma dosagem maior de enzimas na proporção de 15 FPU/g de bagaço seco.

Os experimentos realizados em biorreator, com grau de enchimento de 10% e concentração de 100 g/L de bagaço em solução tampão citrato 50mM a pH 4,8. As condições de operação do biorreator foram: velocidade de rotação do tambor de 15 rpm e temperatura de 50 °C. A concentração de enzima de 7 FPU/g de bagaço seco, foi utilizada para os experimentos para bagaço *in natura* e pré-tratado, e a concentração de 15 FPU/g foi utilizada apenas para os ensaios com bagaço pré-tratado. Em todos os experimentos, as amostras foram retiradas nos tempos 2, 4, 6, 24, 48 e 72 horas e inativadas em água fervente por, aproximadamente 15 minutos.

Resultados e Discussões

Neste capítulo, são abordados aspectos referentes à hidrólise enzimática feita no biorreator (protótipo), na sequência, são apresentados os resultados referentes ao projeto do biorreator tambor rotativo, em grande escala.

5.1. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

Para determinar a composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e quimicamente pré-tratado foi realizado um estudo separado do trabalho desta dissertação. Neste estudo foram empregadas técnicas termoanalíticas, em especial Análise Termogravimétrica e Termogravimetria derivada (TG / DTG), e Análise térmica diferencial (DTA). O emprego da Análise Termogravimétrica (TGA) permite uma determinação semi-quantitativa do conteúdo nas biomassas (CRUZ *et al.*, não publicado).

Tabela 3: Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar (CRUZ et al., não publicado)

PORCENTAGEM DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA ANTES E DEPOIS DE PRÉ-TRATAMENTOS QUÍMICOS				
Amostras	Umidade (%)	Hemicelulose/Celulose (%)	Lignina (%)	Cinza (%)
<i>in natura</i>	5.2±0.2	64.5±2.3	22.8±0.3	4.8±0.3
1 % H ₂ SO ₄	5.4±1.2	55.0±1.5	32.9±0.7	7.6±1.0
1 % NaOH	5.7±0.0	66.5±0.8	23.5±0.3	4.4±0.4
2 % NaOH	3.3±0.2	75.2±0.7	17.1±1.0	4.2±0.0
3 % NaOH	4.7±1.2	67.5±1.1	21.2±0.0	7.0±0.0
4 % NaOH	4.0±0.3	82.0±2.3	6.3±1.6	7.0±0.3
H ₂ SO ₄ – Ácido Sulfúrico; NaOH – Hidróxido de Sódio (pré-tratamento químico)				

O teor de umidade varia pouco com o tratamento, apenas nas amostras tratadas com 2% (v/v) NaOH apresentaram (3,2%), para os outros varia de 4,7% até 5,7%. O comportamento da hemicelulose e celulose, nas amostras de bagaço *in natura*, a hemicelulose foi removida liberando a celulose a partir da estrutura lignocelulósica. Ao comparar as amostras de bagaço pré-tratado quimicamente com H₂SO₄ + NaOH (1 a 4%), observa-se uma elevação na porcentagem de hemicelulose e celulose presente no bagaço, a medida que aumenta a concentração de NaOH, enquanto o teor de lignina decresce. A escolha do pré-tratamento químico de H₂SO₄ + NaOH (1 %) deve-se a consideração feita de que em geral, a análise da composição mostra que o pré-tratamentos com concentrações acima de 2% de NaOH não resultam resultar em maior remoção de hemicelulose e lignina ou no enriquecimento de celulose da amostra. Além disso, o aumento na concentração da solução alcalina pode representar perdas maiores de celulose e maiores custos de processo (REZENDE *et al.*, 2011).

5.1.2 Hidrólise enzimática

Os resultados obtidos com os experimentos realizados tanto em frascos erlenmeyers como em biorreator tambor rotativo são apresentados na Figura 14:

Figura 14: Curva de concentração de glicose liberada durante a hidrólise enzimática (g/L) vs tempo (h)

Nos experimentos realizados, o processo de hidrólise do bagaço finalizou em 24 horas, devido ao não tratamento da biomassa. Neste caso, a matriz de celulose não estava suficientemente exposta para o ataque da enzima. Assim, observou-se a necessidade do pré-tratamento da biomassa.

Inicialmente, neste trabalho foi empregada uma concentração inicial de enzima de 7 FPU/g de bagaço seco, em razão da necessidade de se utilizar a menor concentração recomendada. Considerando que, a dosagem de enzima comumente utilizada nas hidrólises está entre 7 e 33 FPU/g substrato (SUN & CHENG, 2002). Assim, foram realizados experimentos em frascos erlenmeyers e no biorreator. Após 24 horas de experimentos ocorreu uma estabilização da hidrólise da celulose. O mesmo efeito foi observado por SANTOS & GOUVEIA (2009), nos experimentos realizados com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com concentração de 186,16 g/L em frascos erlenmeyers, utilizando uma concentração de enzima Celluclast 1500 de 17,2 FPU/g de bagaço. A fim de contornar este problema, os autores adicionaram, após 46 horas, mais 2 mL de enzima ao processo, na tentativa de

aumentar a conversão da enzima. Contudo, não houve melhora do processo, os autores atribuíram este fato à presença de lignina no meio reacional, o que ocasiona lentidão na conversão e a alta concentração de glicose que inibe a ação das enzimas beta-glucosidasas. Com o objetivo de reduzir os efeitos da inibição durante a hidrólise, alguns procedimentos foram sugeridos por SUN & CHENG (2002), como, a remoção de açúcares (glicose) durante a hidrólise – processo semi-contínuo ou através da ultrafiltração do meio reacional.

Em razão dos resultados obtidos nos experimentos com concentração de enzima de 7 FPU/g de bagaço seco, este valor inicial foi elevado para 15 FPU/g tanto em frascos erlenmeyers como no biorreator tambor rotativo o que acarretou em aumento na conversão da celulose em glicose. No caso do biorreator, o rendimento foi de aproximadamente 85%, devido a melhor transferência de massa e calor e mistura dentro do que equipamento em relação aos frascos erlenmeyers. Nos experimentos efetuados em frascos erlenmeyers, após 48h houve pequena variação da concentração de glicose liberada.

Os estudos realizados por PEREIRA *et al.*, (2010) em reator tipo STR (agitados mecanicamente), capacidade de 1 L, modelo Biostat B-plus, (Sartorius) equipado com turbina, utilizado para hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, sob concentração de 100 g/L, pré-tratado com carga enzimática de 10 FPU/g de bagaço seco (*Trichoderma reesei* RUT C30 e *Aspergillus awamoei* 2B.361 U2/1). Os autores obtiveram, em 40h, 27 g/L de glicose liberada, sendo este valor inferior ao obtido nesta dissertação no experimento com o biorreator.

Nos experimentos realizados por SANTOS *et al.*, (2010) a quantidade de glicose liberada quando se utilizou bagaço com pré-tratamento foi cerca de duas vezes maior que a quantidade de glicose formada com o bagaço *in natura*. Os autores realizaram hidrólises com bagaço de cana-de-açúcar com e sem pré-tratamento, em frascos erlenmeyers de 500 mL e concentração de enzimas de 30 FPU/g de bagaço seco. Para o bagaço sem pré-tratamento, a partir de 10h as concentrações de glicose se mantiveram constantes num valor de aproximadamente 19 g/L. Nos experimentos com bagaço pré-tratado houve formação de glicose até 48h com valor de aproximadamente 52 g/L, após este tempo, a concentração se manteve praticamente constante.

O'DWYER *et al.*, (2006) realizaram experimentos de hidrólise enzimática utilizando palha de milho e diferentes concentrações de enzimas (*Trichoderma reesei* - 0,25-50 FPU/g

de palha seca). Os autores concluíram que o fato da glicose inibir a celulose pode ser devido à glicose se ligar à enzima, pois a glicose tem uma afinidade de ligação igual a da enzima. Outra explicação é dada devido a não preferência e irreversível ligação à lignina (inibição competitiva). Os dados encontrados foram de 10 a 100 g/L durante 72h.

MACHADO (2009) estudou a obtenção de etanol a partir de derivados de processamento de eucalipto para produção de celulose. Nestes experimentos a biomassa (polpa de celulose e serragem) foi pré-tratada e hidrolisada em frascos Duran de 250 mL a uma carga enzimática de 20 FPU/g. Os resultados obtidos de concentração de glicose foram maiores no início do experimento até 10 horas, após este tempo, as concentrações mantiveram seus valores. Isso mostra que a concentração residual de glicose depende da carga enzimática utilizada e determina a tensão devido à limitação por glicose.

RABELO (2010), também obteve melhor resposta de concentração de glicose ao realizar experimentos com bagaço pré-tratado, em frascos erlenmeyers, para obter o máximo de rendimento de glicose. Obteve rendimento de 90,8% para a glicose e 95,6% para a xilose ao realizar experimento com bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio sob concentração de 70 g/L de bagaço e uma concentração elevada de enzima (50 FPU/g de bagaço seco). Para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino, o autor empregou uma concentração menor de enzima (12,7 FPU/g de bagaço seco), e obteve rendimentos próximos de 100% de glicose e 98,7 de xilose. Analisando a curva de glicose vs tempo, atingiram os valores de aproximadamente 19 g/L. O autor também estudou o aumento de concentração de sólidos (10% p/v de sólido para o bagaço pré-tratado com hidróxido de cálcio e com até 5% p/v para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino) em reator num processo de batelada alimentada e como resposta obteve um aumento da concentração de açúcares liberados, porém uma diminuição da eficiência do processo.

Segundo CARRILLO *et al.*, (2005) tanto o excesso de enzima quanto a presença de lignina limitam o processo de difusão da enzima no substrato e, conseqüentemente, a formação de glicose.

FUENTES *et al.*, (2010) estudaram a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com cal, feitos em frascos erlenmeyers e uma concentração enzimática de 5FPU/g de bagaço seco (*Trichoderma reesei*, Sigma). O rendimento médio de concentração

de glicose com bagaço pré-tratado foi de 0,233 g de glicose/g de bagaço *in natura*, para o bagaço sem pré-tratamento o valor foi inferior a 0,1 g de glicose/g de bagaço *in natura*.

5.2. Proposta para construção do biorreator tipo tambor rotativo

A proposta para a construção de um biorreator, em grande escala, para ser empregado no processo de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar é descrita abaixo. Na primeira etapa do projeto foram coletados dados relativos ao processo de hidrólise enzimática e também ao biorreator a ser construído. As informações referentes ao desenvolvimento foram feitas durante a fase experimental desenvolvida no laboratório e protótipo. Nesta fase, com base em dados do projeto inicial e do desenho mecânico foram realizados cálculos para obter o projeto final do biorreator.

Assim, as dimensões do projeto final foram: volume total do equipamento de 0,247 m³, diâmetro de 470 mm e comprimento de 1425 mm. A escolha do material para construção deste equipamento foi de vital importância, o uso do aço inoxidável 316 foi imprescindível devido às reações químicas (toxicidade dos produtos resultantes de uma eventual corrosão), resistência à corrosão, e custo do material. Chapas de 3/16" (5mm) foram propostas para a espessura do material, normalmente em reatores com volume de 30 – 40m³ de capacidade usam-se chapas com 7 mm de espessura e para o corpo com 10 mm de espessura (SCHMIDELL & FACCIOITI, 2001). O biorreator possui aberturas laterais que proporcionam facilidade para colocação e remoção da mistura. O equipamento é composto por 4 aletas equidistantes uma das outras radialmente, fixadas na camisa do tambor, para possibilitar melhor mistura do material que será depositado, aumentar a turbulência e consequentemente a liberação de calor do meio reacional.

O equipamento apresentado na Figura 15, opera em uma faixa de rotação entre 10 a 80 rpm, a temperatura de dentro do equipamento é mantida através de um trocador de calor externo. O tempo da mistura é o tempo necessário para obter uma perfeita homogeneização do meio. Esse tempo aumenta progressivamente à medida que aumenta o tamanho do biorreator.

Figura 15: Desenho de conjunto final do biorreator tambor rotativo

Para melhor entender o projeto: item 01 – é a camisa interna do sistema, item 02 os apoios da camisa interna, item 03 se localiza a camisa externa, item 04 se localiza a tampa para recebimento do material, item 05 a tampa para saída de material, item 06 os mancais de deslizamento, item 07 é a base do sistema todo soldado. Item 08 fica uma bica de saída de material, deste lado a base se apoia em um sistema de molas para inclinação do sistema e saída de material, item 09 - correia para transmissão de movimentos do motor. Nos apêndices A, B e C são apresentados as figuras do conjunto completo e o detalhamento da camisa interna e externa do biorreator.

5.2.1. Sistema de agitação e grau de enchimento

Com base nos resultados de agitação obtidos em testes realizados em um biorreator tipo tambor rotativo (protótipo), a velocidade de rotação estabelecida para ser utilizada no processo de hidrólise do bagaço de cana é de 15 rpm. Assim, os cálculos apresentados na Tabela 4 são fundamentados neste valor e referem-se às análises segundo o grau de enchimento, as variáveis geométricas e ângulo de repouso dinâmico do projeto.

De acordo com os dados do projeto, sendo que o ângulo de ocupação do material corresponde a 90° , o raio do tambor interno tem 0,235m e o externo 0,250m e seu comprimento circular em radianos 0,3689 rad, o grau de enchimento foi de $f = 0,23$.

Calculado também o Fr (número Froud) considerando que a velocidade angular de giro do tambor seja 15 rpm, pois o $N_c = 61,7$ a margem de uso adequada para operação do reator é de 10% do N_c (MITCHELL *et al.*, 2006).

Tabela 4: Resultados dos cálculos para regime de escoamento

Frequencia (RPM)	Grau de enchimento f	Fr (MELLMANN, 2001)	Fr (experimento)	Regime de escoamento
15	0,23	$10^{-3} < Fr < 10^{-1}$	$5,79 \times 10^{-2}$	Cascadeante Sub-tipo cascata

Assim, analisando o valor obtido pode-se concluir que o regime de escoamento no biorreator projetado é de cascadeamento. Neste regime, o processo físico característico é o de mistura sendo sua aplicação em tambores rotativos. Com o grau de enchimento é maior que 0,1, o sub-tipo para este caso é cascata.

XAVIER *et al.* (2009) propôs diferentes velocidades de rotações do tambor para comparar os regimes de escoamento. Os autores constataram que ao variar a frequência, houve mudança do regime de escoamento. Contudo, ao aumentar a carga (quantidade de material dentro do biorreator), não houve mudança do regime, pois estes são caracterizados para $f > 0,1$.

Conclusões e Sugestões

Conclusões

Analizando os resultados deste trabalho, desde a construção do protótipo do biorreator tipo tambor rotativo até a hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a comparação da hidrólise no tambor rotativo e em frascos erlenmeyers comprova que o uso da hidrólise em grande escala é viável e apresenta certas vantagens como: visualização das alterações na mistura, variação da agitação, possibilidade e controle de temperatura dentro do tambor.

O biorreator projetado para ser utilizado no processo de hidrólise enzimática possibilitará uma mistura adequada do meio reacional com base nos cálculos avaliados. O regime de escoamento (cascadeamento, sub-tipo: cascata), é caracterizado pela boa mistura do meio reacional, não havendo dependência do grau de enchimento do tambor, apenas das frequências de rotação.

Sugestões para trabalhos futuros

Para trabalhos futuros, sugere-se o aprofundamento do aprendizado desenvolvido nesta dissertação a seguir:

- Aumento das concentrações de sólidos no processo de hidrólise enzimática no biorreator para 30, 50 e 70% (p/v);
- Variação das concentrações de enzimas visando otimizar o processo;
- Variação da velocidade no biorreator utilizado neste trabalho.

Referências Bibliográficas

AGUDELO, L.M.G. *Avaliação de um biorreator rotativo para fermentação em estado sólido*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2010.

AIBA, S, SHODA, M, NAGATANI, M. *Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation*. Biotechnology and Bioengineering, 10, 845–64, 1968.

ALFENORE, S; CAMELEYRE, X; BENBADIS, L; BIDEAUX, C; URIBELARREA, J.L; GOMA, G; MOLINA-JOUVE, C; GUILLOUET, S.E. *Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in Saccharomyces cerevisiae fed-batch process*. Applied Microbiology and Biotechnology, 63, 537–542, 2004.

ANDRIETTA, S.R; STECKELBERG, C; ANDRIETTA, M.G. *Study of flocculent yeast performance in tower reactors for bioethanol production in a continuous fermentation process with no cell recycling*. Bioresource Technology, 99, 3002–3008, 2008.

ASHLEY, V.M.; MITCHELL, D.A.; HOWES, T. *Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors*. Biochemical Engineering Journal, Amsterdam, v.3, n.2, p.141-150, 1999.

BLUMBERG, W. *Convection- and contact drying in the rotary drum*. VDI Fortschrittsbericht Nr.384, VDI-Verlag, Düsseldorf, 1995.

BRÁNYIK, T; VICENTE, A.A; DOSTÁLEK, P; TEIXEIRA, J.A. *Continuous beer fermentation using immobilized yeast cell bioreactor systems*. Biotechnology Progress; 21,653–63, 2005.

CARRILLO, F.; LIS, M.J.; COLOM, X.; LOPEZ-MESAS, M.; VALLDEPERAS, J. *Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study*. Process Biochemistry. v.40, 3360, 2005.

CARVALHO, M.L. *Estudo Cinético da Hidrólise Enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar*. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. *Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate*. International Biodeterioration & Biodegradation. V.59, p.85, 2007

CHEN, H.; QIU, W. *Key technologies for bioethanol production from lignocelluloses*. Biotechnology Advances, v.28, p. 556-562, 2010.

CHISTI, Y; MOO-YOUNG, M. *Bioreactors*. Encyclopedia of Physical Science and Technology. 3.ed, 2, 247-271, 2002.

CRUZ, G.; MONTEIRO, P.A.S; BRAZ, C.E.M.; SELEGHIN, P.J.; POLIKARPOV, I. CRNKOVIC, P.M. *Thermal and morphological evaluation of chemically pretreated sugarcane bagasse*, não publicado.

DIAS, M.O.S.; JUNQUEIRA, T.L.; JESUS, C.D.F.; ROSSELL, C.E.V.; FILHO, R.M.; BONOMI, A. *Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane*. Energy v.43, p.246-252, Campinas, São Paulo, 2012.

DIEDRICH, U. *Analysis of the motion in a ball mill examined at a Modellmahlkammer with smooth inner surface by means of photography and cinematography*. Dissertation, Hochsch. F. Schwermaschinenbau Magdeburg, 1961.

DURAND, A. *Bioreactor design for solid state fermentation*. Biochemical Engineering Journal, Amsterdam, v.13, p.113-125, 2003.

DURAND, A, CHEREAU, D. *A new pilot reactor for solid-state fermentation: Application to the protein enrichment of sugar beet pulp*. Biotechnology and Bioengineering. 31:476–486, 1988.

DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. *Solid Substrate Cultivation*. En: Elsevier Science Publishers LTD. Ed: Crow House, Linton Road, Barking, Essex, England: 466, 1992.

ELISASHVILI, V.I.; KHardZIANI, T.S. TSIKLAURI, E.T. *Cellulase and xylanase activities in higher basidiomycetes* Biochemistry-Moscow v.64, p.718-722, 1999.

EKLUND, R.; GALBE, M.; ZACCHI, G. *Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow*. Enzyme Microbiology Technology V.12, p.225-228, 1990.

FENGEL, D.; WENEGER, G. *Studies on the delignification of spruce wood by organosolv pulping using sem-edxa and tem*. Wood science and technology. Berlin:v.23, p.123-130, 1989.

FERNÁNDEZ, D.E.R. *Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial*. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, departamento de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Curitiba, 2009.

FERRAZ, A.; MENDONÇA, R.; SILVA, F.T. *Organosolv delignification of white- and brown-rotted Eucalyptus grandis hardwood*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.75, p.18-24, 2000.

FUENTES, L.G.; RABEL, S.C.; FILHO, R.M.; COSTA, A.C. *Kinectic of lime pretreatment of sugarcane bagasse to enhance enzymatic hydrolysis*. Applied Biochemistry Biotechnology, 163, p.612-625, 2010.

GAN, Q.; ALLEN, S.J.; TAYLOR, G. *Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling*. Process Biochemistry., v.38, p.1003-1018, 2003.

GHADGE, R.S.; PATWARDHAN, A.W.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B. *Effect of flow pattern on cellulose deactivation in stirred tank bioreactors*. Chemical Engineering Science, v.60, p.1067-1083, 2005.

GHOSE, T.K. *Pure and Applied Chemistry*. Journal of chemical physics, v.59, p.257-268, 1959

HOJO, O; HOKKA, C.O; MAIOR, A.S. *Ethanol Production by a Flocculant Yeast Strain in a CSTR Type Fermentor with Cell Recycling*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 77–79, 535-545, 1999.

HON, D.N.S. *Chemical modification of lignocellulosic materials*. Forest Production journal, p.370, 1996.

KOURKOUTAS, Y; BEKATOROU, A; BANAT, I.M; MARCHANT, R; KOUTINAS, A.A. *Immobilization technologies and supporting materials suitable in alcohol beverages production: a review*. Food Microbiology, 21, 377–97. 2004.

KRISTENSEN, J.B.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. *Yeld-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocelluloses*. Biotechnology for Biofuels, 2:11, p 1-10, 2009.

LAUKEVICS, J.J.; APSITE, A.F.; VIESTURS, U.E.; TENDERDY, R.P. *Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein*. Biotechnology and Bioengineering., v.26, p.1465-74, 1984.

LEE, C.W, CHANG, H.N. *Kinetics of ethanol fermentation in membrane cell recycle fermentor*. Biotechnology and Bioengineering, 29, 1105–12. 1987.

LIMA, T. *Modelo de Inferência para a estimação da umidade do leito de um biorreator de fermentação no estado sólido*. (Dissertação-Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Química, Curitiba, 2009.

LÜBBEHÜSEN, T.L; NIELSEN, A.J; MCINTYRE, A.M. *Aerobic and anaerobic ethanol production by Mucor circinelloides during submerged growth*. Applied Microbiology and Biotechnology, 63, 543–548, 2004.

MACHADO, A.T.; ZANGIROLAMI, T.C.; ADRIANO, W.S. *Obtenção de etanol a partir de derivados do processamento do eucalipto para produção de celulose por sacarificação e fermentação simultâneas*. VIII Congresso Brasileiro de engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia, Minas Gerais, 2009.

MARQUES, B.C. *Aprimoramento da abordagem para modela o balance de água em biorreatores de fermentação em estado sólido*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Departamento de Pós-Graduação em Engenharia, Curitiba, 2005.

- MARSH, A.J.; STUART, D.M.; MITCHELL, D.A.; HOWES, T. *Characterizing mixing in a rotating drum bioreactor for solid-state fermentation*. Biotechnology Letters, v.22, p.473–477, 2000.
- MELLMANN, J. *The transverse motion of solids in rotating cylinders-forms of motion and transition behavior*. Powder Technology, v118, p.521-270, 2001.
- MELLMANN, J. *Zonal solids mass flow for flame-heated rotary drum reactors* Dissertation, TU Magdeburg, 1989
- MELO, L.C.P; SANTOS, M.M.; GALVÃO, A.C.F.; ASSUNÇÃO, F.C.R. *Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil*. Brasília, DF- Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2009.
- MITCHELL, D.A.; STUART, D.M.; HARDIN, M.T.; KRIEGER, N. Rotating-Drum and Stirred-Drum Bioreactors. In: *Solid-State Fermentation Bioreactors – Fundamentals of design and operation*. Berlin: Springer-Verlag, cap.8, 2006.
- MOVAGARNEJAD, K; SOHRABI, M; KAGHAZCHI, T; VAHABZADEH, F. *A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid–liquid systems*. Biochemical Engineering Journal, 4, 197–206, 2000.
- NAGASHIMA M, AZUMA M, NOGUCHI S, INUZUKA K, SAMEJIMA H. *Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells*. Biotechnology and Bioengineering, 26, 992–997, 1984.
- NAGEL, F.J.J.I.; TRAMPER, J.; BEKKER, M.S.N.; RINZEMA, A. *Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation*. Biotechnology and Bioengineering 72:219-230, 2000.
- OLIVEIRA, P.D. *Bioprocessos*, Palestra sobre bioprocessos fermentativos, 2010, Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.ufpel.edu.br/d87b9597dc6a45e6c8190d87e343491e-1>>. Acesso em 03 dez. 2012.
- OCTAVIANO, C. *Hidrólise enzimática para produção do etanol volta ao palco*. JornalCana, São Paulo, Junho 2011.

O'DWYER J.P.; ZHU, L.; GRANDA C.B.; HOLTZAPPLE M.T. *Enzymatic hydrolysis of lime-pretreated corn stover and investigation of the HCH-1 Model: Inhibition pattern, degree of inhibition, validity of simplified HCH-1 Model*. Bioresource v.98, p.2969-2977, 2006.

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

OJEDA, K.; KAFAROV, V.; *Exergy analysis of enzymatic hydrolysis reactor for transformation of lignocellulosic biomass to bioethanol*. Chemical Engineering Journal. V.154, p.390-395, 2009

ONKEN, U; WEELAND, P. *Airlift fermenters: Construction, Behavior and uses*. Advances in Biotechnological Process, v.18, p.67-95, 1983.

ORPE, A.V.; KHAKHAR, D.V. *Scaling relations for granular flow in quasi-two-dimensional rotating cylinders*. Physical Review E: Statical, Nonlinear and Soft Matter Physics, New York, v.64, n.3, id. 031302, 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. *Aspects of design of fermenter in solid state fermentation, Solid State Fermentation in Biotechnology: fundamentals and applications*. New Delhi: Asiatech Publishers. p. 73–77, 2001.

PEREIRA, J. *Instrumentação e controle de reatores enzimáticos para a produção de etanol utilizando bagaço de cana-de-açúcar*. Relatório parcial de iniciação científica, 2013.

PHLIPPIDIS, G.P.; SMITH, T.K.; WYMAN, C.E. *Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process*. Biotechnology and Bioengineering. V.41, p.846-853, 1993.

PINHEIRO, I.R. *Estudo da produção do antiótico antitumoral retamicina em biorreatores com células imobilizadas de Streptomyces olindensis ICB20*. 2007. 136p. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química, São Paulo, 2007.

POLIDORO, T.A. *Desenvolvimento de biorreator de tambor rotativo em escala de bancada*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Caxias do Sul, 2009.

RABELO, S.C.; RIVERA, E.C.; GARCIA, D.R. *Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks*. Journal of Chemical Technology and biotechnology, v.85, p.983-992, 2010.

RAMOS, L.P. *The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials*. Química Nova, v.26, p.863-871, 2003.

RANI, R.; KUMAR, A.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; *Recent advances in solid-state fermentation*. Biochemical Engineering Journal, Amsterdam, v.44, p.13-18, 2009.

REUTER, G. *The transport and mixing behavior of rotary kiln Möller in producing sponge iron*. Dissertation, RWTH Aachen, 1975.

REZENDE, C.A.; LIMA, M.A.; MAZIEIRO, E.R.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. *Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility*. Biotechnology for Biofuels, v.4, n.54, p.1-19, Nov.2011.

ROBLE N.D; OGBONNA A.J.C; TANAKA A.H. *A novel circulating loop bioreactor with cells immobilized in loofa (Luffa cylindrica) sponge for the bioconversion of raw cassava starch to ethanol*. Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 671–678, 2003.

ROCHA, G.J.M.; CONÇALVES, A.R.; GÓMEZ, E.O., ROSSELL, C.E.V. *Compositional variability of raw, steam-exploded and delignified sugarcane bagasse*. In: Congresso Internacional sobre Geração Distribuída e Energia no meio Rural (AGRENER GD 2010). Anais, 2010.

RODRÍGUEZ, S.; SAROMÁN, M. *Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production*. Biochemical Engineering Journal, Amsterdam, v.22, p.211-219, 2005.

SANTOMASSO, A.; OLIVI, M.; CANU, P. *Mechanisms of mixing of granular materials in drum mixers under rolling regime*. Chemical Engineering Science, v.59, p.3269-3280, 2004.

SANTOS, D.T.; SARROUH, B.F.; SANTOS, J.C.; PEREZ, V.H.; SILVA, S.S. *Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia*. Janus, Lorena, a.3, n.4, 2.sem, 2006.

SANTOS, J.R.A.; GOUVEIA, E.R. *Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar*. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.11, p.27-33, 2009.

SANTOS, J.R.A.; SOUTO-MAIOR, A.M.; GOUVEIA, E.R.; MARTIN, C. *Comparison of SHF and SSF process from sugar cane bagasse for ethanol production by Saccharomyces cerevisiae*. Quimica Nova v.33, n.4, São Paulo, 2010

SHELL, D.J.; RILEY, C.J.; DOWE, N.; FARMER, J.; IBSEN, K.N.; RUTH, M.F.; TOON, S.T.; LUMPKIN, R.E. *A bioethanol process development unit: initial operating experiences and results with a corn fiber feedstock*. Bioresource Technology, 91 179–188, 2004.

SCHEPER, T. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 1.ed.Nova Iorque: Springer, 2000.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. *Biorreatores e Processos Fermentativos*. In: *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. 1º ed, São Paulo: Edgard Blücher, v.II, cap.8, 2001.

SCHÜGERL, K. *Bioreaction Engineering*. vol.2: *Characteristic Features of Bioreactors*. John Wiley and Sons, 1987.

SIQUEIRA P.F.; KARP S.G.; CARVALHO J.C.; STURM W.; RODRIGUEZ-LEÓN J.A.; THOLOZAN J.; SINGHANIA R.R.; PANDEY A.; SOCCOL C.R. *Production of bio-ethanol from soybean molasses by Saccharomyces cerevisiae at laboratory, pilot and industrial scales*. Bioresource Technology, 99, 8156–8163, 2008.

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

VERBELEN P.J., SCHUTTER D.P.D., DELVAUX F., VERSTREPEN K.J., DELVAUX F.R. *Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation application*. Biotechnology Letters, 28, 1515–25, 2006.

VITOLO, M. *Reatores com enzimas imobilizadas*. In: *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo. Editora Edgard Blücher Ltda, 373-396, 2001.

WANG, E.; LI, S.; TAO, L.; GENG, X.; LI, T. *Modeling of rotating drum bioreactor for anaerobic solid-state fermentation*. Applied Energy, 87(9), 2839-2845, 2009.

XAVIER, N.M.; AGUDELO, L.M.G.; THOMÉO, J.C. *Característica de movimentação e mistura de partículas de um biorreator rotativo para fermentação em estado sólido*. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, Uberlândia, Minas Gerais, 2009.

Apêndices

APÊNDICE B: DESENHO DA CAMISA INTERNA DO BIORREATOR PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.

APÊNDICE C: DESENHO DA CAMISA EXTERNA DO BIORREATOR PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA