



ATIVIDADE BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOBUTANOL

Ingra Ancelmo Costa¹, Karina Freire d'Eça Nogueira Santos², Alliny das Graças Amaral³

Farmacêutica pela Universidade Estadual de Goiás Campus Central, Anápolis Goiás¹, Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná³, Professora e pesquisadora da Universidade Estadual de Goiás - Campus Central, Anápolis Goiás³ - alliny.amaral@ueg.br

Recebido em: 15/11/2022 – Aprovado em: 15/12/2022 – Publicado em: 30/12/2022
DOI: 10.18677/EnciBio_2022D39

RESUMO

A substituição dos combustíveis fósseis pelos biocombustíveis é de grande importância econômica, uma vez que há um constante aumento de preço do petróleo em decorrência da diminuição de suas reservas, ou mesmo por questões ambientais, que incentivam a procura por combustíveis provenientes de fontes renováveis e que proporcionem menor emissão de gases indutores do efeito estufa. Várias espécies de *Clostridium* são capazes de produzir o solvente acetona, butanol e etanol (ABE) pela fermentação de variados substratos. Nesse cenário, o butanol tem se tornado um interessante substituto para o etanol em aplicação como aditivos de combustíveis, devido às suas propriedades físico-químicas. Foi provado que é possível utilizar o butanol diretamente em motores à gasolina, sem necessidade de modificação. No entanto, há uma dificuldade na produção de ABE por esses microrganismos, devido ao fato de o produto fermentado ser tóxico a eles, quando em altas concentrações, evidenciando a necessidade de métodos que os tornem mais resistentes a esta toxicidade, ou que não haja contato do produto com o microrganismo. Outro gargalo corresponde ao fato de a rota bioquímica de produção de butanol ainda apresentar custo elevado, quando comparada com a rota petroquímica, especialmente devido ao alto custo dos componentes do meio de cultivo. Visando tornar a produção biotecnológica do butanol mais competitiva, esforços vêm sendo feitos para minimizar o custo desse processo. O objetivo deste trabalho foi reunir os principais aspectos envolvidos para a produção de biobutanol, através de informações atualizadas sobre tecnologias e processos de produção no setor industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Biocombustíveis, butanol, *Clostridium sp.*

BIOCHEMICAL ACTIVITY OF BACTERIA PRODUCING BIOBUTANOL

ABSTRACT

The replacement for fossil fuels to biofuels has a great economic importance, since there is a constant increase in the oil price due to the decrease in the reserves, or even due to environmental issues, which encourage the search for fuels from renewable sources and that provide lower emission of greenhouse gases. Several species of *Clostridium sp.* are able to producing the solvent Acetone, Butanol and Ethanol (ABE) by fermentation from different substrates. In this scenario, butanol has become an interesting substitute for ethanol in application as fuel additives, due to its physicochemical properties. It has been proven that it is possible to use butanol directly in gasoline engines, without any modification. However, there is a difficulty in the EBA production by these microorganisms, due to the fact that the fermented product is toxic to them, when in high concentrations, evidencing the need for methods that make them more resistant to this toxicity, or that there is no contact of the product with the microorganism. Another bottleneck corresponds to the fact that the biochemical pathway of butanol production still has a high cost, when compared to the petrochemical pathway, especially due to the high cost of the culture medium components. In order to make the biotechnological production of butanol more competitive, efforts has been made to minimize the cost of this process. The goal of this work was to gathering main aspects involved in the biobutanol production, through update information about to technologies production and production processes in the industrial sector.

KEYWORDS: Biofuels, butanol, *Clostridium sp.*

INTRODUÇÃO

O foco na substituição de combustíveis fósseis tem se tornado crescente no cenário atual do mundo seja pelo constante aumento de preço do petróleo em decorrência da diminuição das reservas, ou mesmo por questões ambientais, que incentivam a procura por combustíveis provenientes de fontes renováveis e que proporcionem menor emissão de gases indutores do efeito estufa. Nesse contexto, os processos fermentativos aparecem como soluções promissoras à obtenção de biocombustíveis, como por exemplo, o biobutanol, que pode ser sintetizado biologicamente e aplicado aos motores atuais (CHEN *et al.*, 2013).

Os principais obstáculos para esse tipo de produção são a inibição do crescimento bacteriano pelo produto butanol, baixa produtividade e o uso de substratos caros, situações que podem levar a inviabilidade econômica do processo (HUFFER *et al.*, 2011). A aplicabilidade do butanol vai além da sua utilização como combustível, mas também como uma matéria-prima na indústria química, sendo empregado na produção de tintas, solventes, plastificantes e lubrificantes, além dos processos de extração de ativos farmacêuticos e cosméticos, em defensivos como fungicidas, herbicidas, inseticidas, entre outras finalidades (PRATTO, 2019).

A principal via de síntese industrial do butanol é a hidroformilação do propeno, conhecida como síntese OXO, que consegue obter toneladas de petrobutanol (butanol por rota petroquímica). Na primeira etapa, o propeno reage com o gás de síntese (monóxido de carbono e hidrogênio), utilizando catalisador metálico (Co, Rh ou Ru), obtendo uma mistura de aldeídos. Posteriormente, os aldeídos são hidrogenados para a obtenção do butanol. As taxas isoméricas de butanol obtidas dependem das condições de pressão, temperatura e catalisador

empregado Essa via de síntese se tornou a mais bem-sucedida por ser um processo de tecnologia mais barata, comparado com as opções de síntese de Reppe, onde o propeno reage com monóxido de carbono e água, em presença de catalisador, obtendo butanol em condições brandas de temperatura e pressão. (LEE *et al.*, 2008; MASCAL, 2012).

Já a hidrogenação do crotonaldeído, que consiste em uma condensação, seguida por desidratação e hidrogenação de aldóis, pode ser realizada a partir de etanol, evidenciando uma rota alternativa à petroquímica. Nesse caso, o etanol deve ser desidrogenado para formar acetaldeído e, então, proceder a hidrogenação. Com isso, o desenvolvimento de produtos químicos renováveis para substituir matéria-prima de origem fóssil na indústria química é essencial (LEE *et al.*, 2008).

Ainda o interesse pela produção de biobutanol por rota fermentativa, através do processo ABE (Acetona-Butanol-Etanol), vem sendo retomado por algumas companhias, pois consegue usar como ponto de partida diversos tipos de biomassas para obtenção desse biocombustível. No entanto, o foco dos estudos atuais para esse processo está em conseguir aprimorar o rendimento na produção. A recuperação é também um ponto a ser considerado, visto que a destilação pode ser empregada, mas aumenta os custos em energia pelo elevado ponto de ebulição do biobutanol (NATALENSE, 2013).

O glicerol como um coproduto da produção de biodiesel, com baixa demanda na sociedade atual, é uma alternativa a ser utilizada como fonte de carbono para a produção do biobutanol. Em temperatura ambiente, o glicerol é um líquido transparente, inodoro, viscoso e de sabor doce. A presença dos grupos OH do glicerol o torna passível de várias reações e processos químicos e assim de transformá-lo em produtos de maior valor agregado (PEITER *et al.*, 2016).

Os principais microrganismos capazes de produzir biobutanol são: *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Clostridium pasteurianum*, *Saccharomyces cerevisiae* e *E. coli* (geneticamente modificada). Diante do fato que as bactérias do gênero *Clostridium*, são gram-positivas e intolerantes à presença de oxigênio, o que caracteriza uma dificuldade ao processo de produção (KNOSHAUG; ZHANG 2009; MASIERO *et al.*, 2011)

Face ao exposto o objetivo foi caracterizar os principais microrganismos produtores de biobutanol, e que utilizam como substrato o glicerol, por meio da reunião de informações atualizadas sobre tecnologias e processos de produção, com foco em incentivar e fortalecer a aplicação desses microrganismos no setor industrial, considerando-se que a atividade se revela como uma opção eficiente, integradora e com potencial de realização.

Perspectivas sobre o meio ambiente, produção e uso do biobutanol

Com as flutuações dos preços do petróleo e crescimento das preocupações ambientais, a bioenergia vem atraindo os olhares de vários pesquisadores, por se mostrar uma solução promissora ao efeito estufa e as crises energéticas (LEE *et al.*, 2010; KANNO *et al.*, 2013).

O biobutanol surge nesse cenário com uma série de vantagens em comparação ao etanol, possuindo maior conteúdo energético ($33,81 \text{ MJ kg}^{-1}$) em relação ao etanol ($26,8 \text{ MJ kg}^{-1}$), ser menos corrosivo do que este, além de ter boa miscibilidade tanto com gasolina quanto com óleo diesel e ser compatível com os motores existentes atualmente (BHATTACHARYA *et al.*, 2004; DÜRRE, 2007; PEREIRA; NEVES, 2016).

Houve uma aceleração da queima de combustível e aumento da eficiência do motor ao se utilizar a mistura de butanol e gasolina, comparando ao uso somente de gasolina, além de grande diminuição da produção de fumaça com a mistura butanol/diesel (TORNATORE *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013).

No Brasil e no mundo várias pesquisas têm sido realizadas objetivando a obtenção de butanol renovável, o chamado biobutanol, que possui diversas aplicações, não apenas na indústria automobilística como combustível, mas também utilizado em cosméticos e produtos químicos (LEMES; SOUZA, 2014). O início da produção industrial de biobutanol ocorreu ano de 1912, com o pesquisador Chaim Weizmann, que desenvolveu o processo fermentativo chamado ABE (acetona-butanol-etanol), para isso ele utilizou a bactéria *Clostridium acetobutylicum* (NATALENSE, 2013).

Com o tempo a produção de biobutanol declinou em decorrência do aumento dos preços da matéria prima, o melaço, usado no processo, juntamente com o crescimento da produção de butanol por meio de vias petroquímicas. Assim, a substituição do melaço por outra fonte de carbono para a produção de biobutanol, como por exemplo, o glicerol, seria de alta relevância econômica e ambiental. (RODRIGUES, 2011).

O glicerol tem características promissoras para a produção sustentável de biobutanol, visto que o glicerol é o principal subproduto da produção de biodiesel. Com o constante crescimento da indústria do biodiesel uma enorme quantidade de glicerol é gerada, na proporção de 10 galões de biodiesel para um galão de subprodutos de glicerol, acarretando um forte interesse na reutilização deste glicerol como substrato para a produção de biobutanol. Esta reciclagem do glicerol resolveria também o problema de descarte do mesmo no meio ambiente (LIN *et al.*, 2015). Alguns estudos na literatura têm demonstrado a capacidade de microrganismos do gênero *Clostridium sp.* em produzir biobutanol a partir de meio contendo glicerol a 3% como fonte de carbono de forma eficiente (PANITZ *et al.*, 2014).

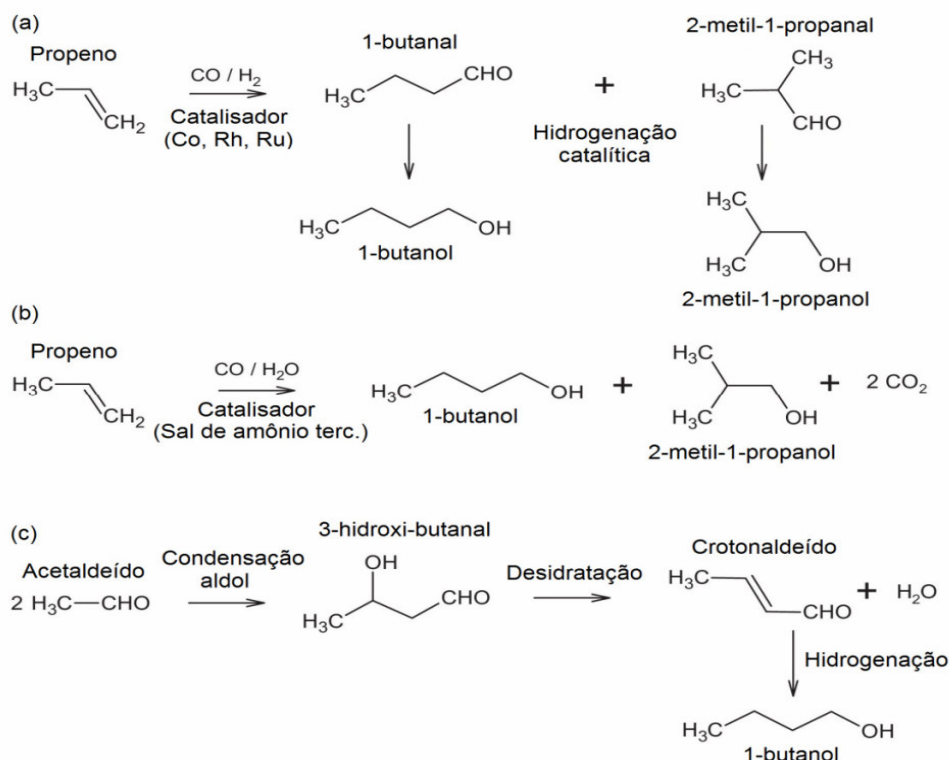
A produção de biobutanol por rotas biológicas

No Brasil, durante o período do Proálcool, o butanol foi produzido a partir da conversão de etanol a butanol, por desidrogenação do etanol, gerando hidrogênio e acetaldeído, e o hidrogênio utilizado na hidrogenação do crotonaldeído, gerando butanol (PEREIRA; NEVES, 2016).

A síntese de butanol ocorre por meio de três principais processos: 1) A hidroformilação ou processo oxo, uma oleofina como, por exemplo, o propileno, reage com monóxido de carbono e hidrogênio formando um aldeído que posteriormente é convertido em butanol (NATALENSE, 2013). Os compostos de aldeído formados pela hidroformilação são a base para a síntese de muitos outros compostos, incluindo: álcoois, aminas, ácidos carboxílicos e outros; 2) A síntese reppe consiste na carbonilação do propeno, o propeno juntamente com monóxido de carbono e água reagem na presença de sal de amônio terciário ou carbonilhidretos de ferro polinucleares, como catalisador da reação, formando diretamente butanol e propanol na proporção 84:14; e 3) A hidrogenação do crotonaldeído, que consiste na condensação aldol de duas moléculas de acetaldeído na presença de catalisador alcalino, fornecendo o intermediário crotonaldeído, que em seguida é desidratado e hidrogenado formando butanol (BRANDÃO, 2017).

A Figura 1 ilustra os processos petroquímicos de produção do butanol: (a) síntese oxo, (b) síntese Reppe e (c) hidrogenação do crotonaldeído.

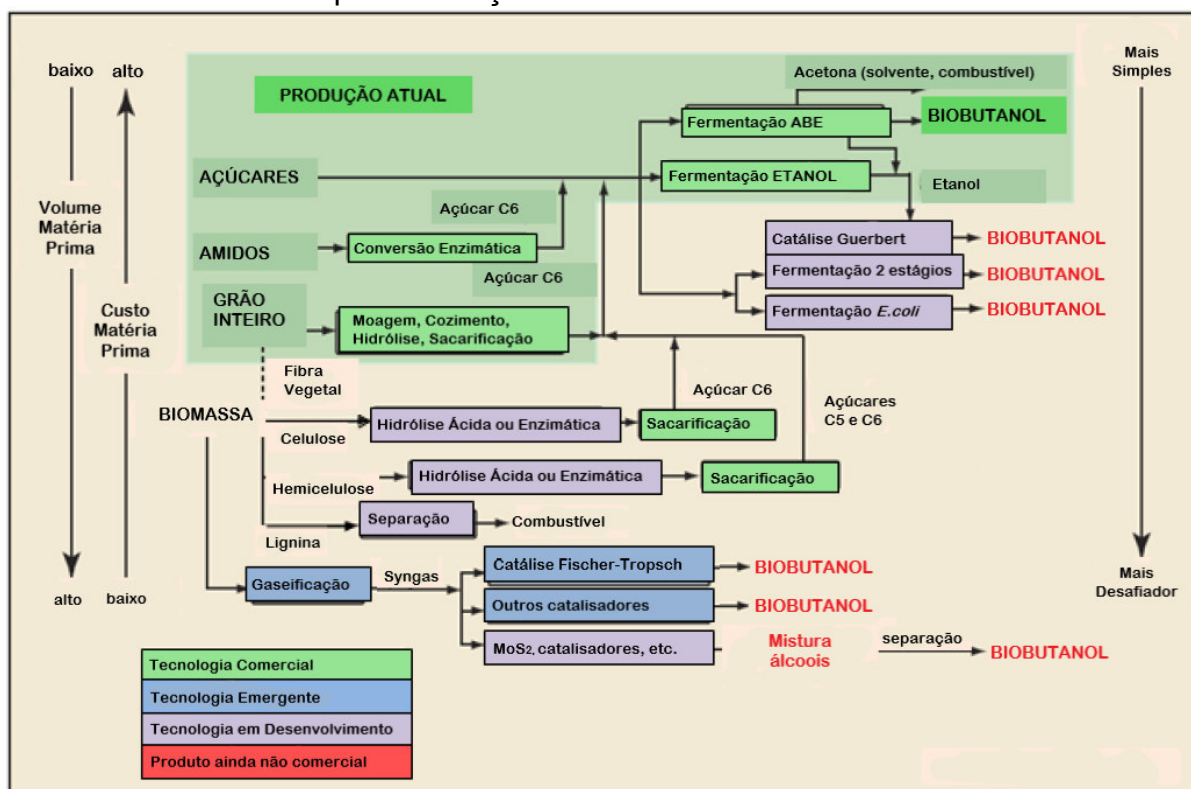
FIGURA 1 - Produção do butanol por meio de processos petroquímicos: (a) síntese oxo, (b) síntese Reppe e (c) hidrogenação do crotonaldeído.



Fonte: Adaptado de Uyttebroek *et al.* (2015).

Dos três processos, a síntese oxo ainda tem sido a mais bem-sucedida e empregada. Já a Figura 2, resume os principais processos existentes ou em desenvolvimento para a obtenção do biobutanol, realizado com matérias-primas de biomassa, de acordo com Cascone (2009).

FIGURA 2 - Processos para obtenção de biobutanol



Fonte: Adaptado de Cascone, 2009.

A produção de biobutanol é mais bem caracterizada para a espécie *Clostridium acetobutylicum*, o seu processo de fermentação está dividido em duas fases distintas (CASONE, 2009):

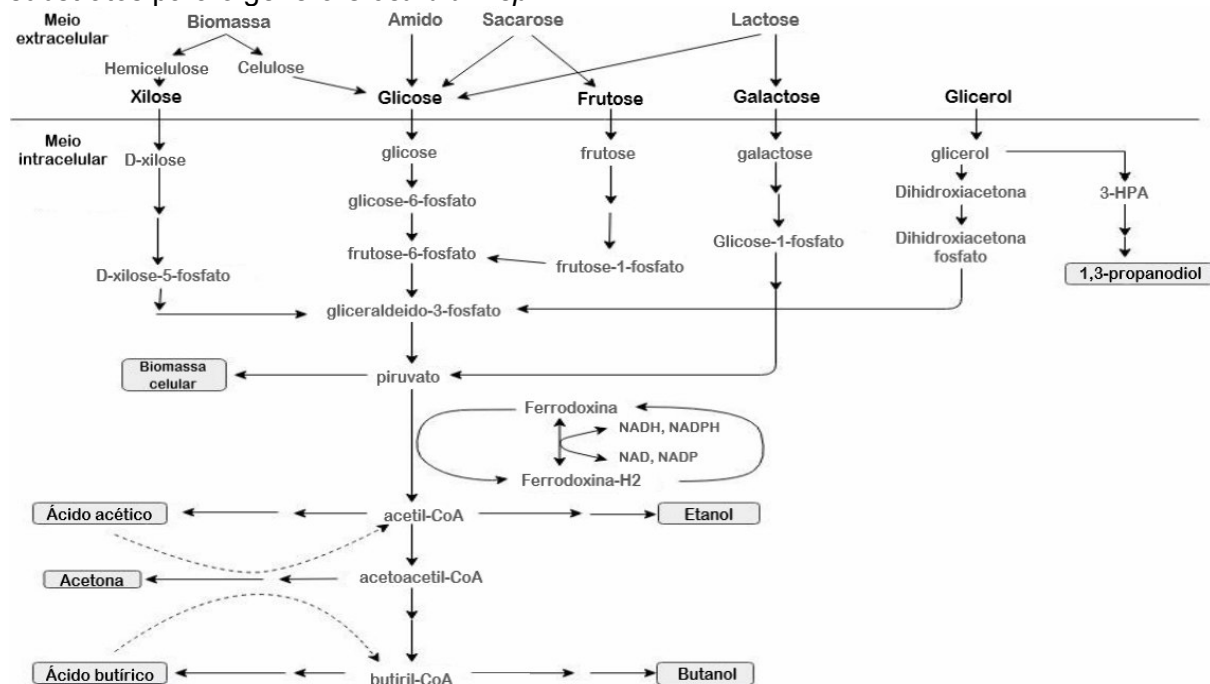
1) Fase de acidogênese: as células apresentam metabolismo acidogênico e no início do crescimento o pH do meio está em torno de 5,8. Nesta fase ocorre crescimento celular exponencial e produção concomitante dos seguintes compostos: dióxido de carbono, hidrogênio, ácido acético e ácido butírico, pela presença desses ácidos o pH do meio de cultura se acidifica chegando em torno de 4,5. Nessa fase o crescimento celular se torna estacionário e ocorre o início da fase de solventogênese.

2) Fase de solventogênese: nessa etapa o pH desempenha importante influência, de modo que quanto menor o pH, maior é a concentração de ácidos não dissociados, a troca do metabolismo acidogênico para solventogênico acontece em pH abaixo de 5,0. Os ácidos produzidos na etapa de acidogênese são consumidos formando os solventes acetona e butanol (GRIMMLER *et al.*, 2011; MASIERO *et al.*, 2011).

A limitação dessa fermentação é a toxicidade dos solventes, em especial o butanol, quando em concentração aproximada de 13 g.L⁻¹, é capaz de cessar o metabolismo celular e provocar rompimento dos componentes fosfolipofílicos da membrana celular (MASIERO *et al.*, 2011).

A Figura 3 ilustra, de maneira condensada, possíveis vias fermentativas partindo de diferentes substratos que podem ser metabolizados pelo gênero *Clostridium sp.*

FIGURA 3. Esquema simplificado de vias metabólicas para fermentação de diferentes substratos para o gênero *Clostridium sp.*



Fonte: Adaptado de Ribeiro (2019).

Recuperação do biobutanol

Outra dificuldade do processo está na recuperação do biobutanol, em vista da baixa produção que torna necessária o gasto de uma grande quantidade de energia para removê-lo do meio (NATALENSE, 2013; HUANG *et al.*, 2014). Abaixo estão os principais processos utilizados como alternativa para a recuperação do biobutanol do meio de acordo com Natalense (2013):

Extração por gás de arraste: nessa técnica, pode-se empregar nitrogênio ou gás carbônico como gás de arraste. Os próprios gases da fermentação podem ser recuperados e reutilizados no reator, capturando os solventes, que por sua vez, são recuperados por condensação. Em seguida o gás é reciclado e enviado novamente ao reator.

Extração líquido-líquido: nesse caso, um solvente é adicionado ao caldo de fermentação, solubilizando os produtos butanol, acetona e etanol, que posteriormente são recuperados por destilação. Um dos produtos utilizados nessa técnica é o decanol (NATALENSE, 2013);

Perstração: pelo fato de existirem diversos problemas associados a extração líquido-líquido, incluindo a toxicidade do solvente extrativo para as células dos microrganismos. Nesse processo, existe uma membrana que separa o caldo da fermentação e o líquido extrator, proporcionando uma grande área superficial, através da qual as duas fases imiscíveis podem trocar butanol. Por não haver contato entre as duas fases, a toxicidade do líquido extrator não afeta o caldo de fermentação (EZEJI, 2007).

Pervaporação: esse também é um processo baseado em membranas, que permite a remoção seletiva de compostos voláteis do caldo fermentativo. O solvente permeia pela membrana e é recuperado por destilação. A eficácia da separação, no entanto, depende da seletividade e fluxo através da membrana (RANJAN; MOHOLKAR, 2012).

Microrganismos fermentativos visando à produção de butanol

O microrganismo modelo na fermentação ABE é a bactéria *Clostridium acetobutylicum*, uma vez que seu metabolismo é bastante descrito na literatura, tendo as enzimas e genes envolvidos na produção de butanol identificados e caracterizados (KÖPKE, 2011).

Todas as espécies do gênero *Clostridium sp.* são bactérias estritamente anaeróbias, formadoras de esporos e possuem formato de bastonete. Em sua maioria, são Gram positivas e não redutoras de sulfato. Esses microrganismos, crescem rapidamente na faixa de pH de 6,5 a 7, e em temperaturas entre 30 e 37°C. A maioria das espécies crescem heterotroficamente em açúcares e formam ácido butírico como produto principal da fermentação. Já as espécies denominadas homoacetogênicas produzem ácido acético como produto principal. Embora anaeróbicas algumas espécies apresentam maior tolerância ao oxigênio, podendo inclusive crescer na presença de ar atmosférico, sendo seu esporo completamente resistente ao O₂ (RIBEIRO, 2019).

O grande gargalo da bioprodução desse álcool é que geralmente os microrganismos são sensíveis ao butanol gerado, levando à inibição do seu crescimento, o que afeta a viabilidade da produção (MASIERO *et al.*, 2011; VISIOLI *et al.*, 2015). Em alta concentração, o butanol diminui a atividade de ATPases e desestabiliza a estrutura lipídica da membrana celular. Portanto, é esperado que cepas solventes tolerantes possam reduzir o custo final, diminuindo cerca de 50% o custo da purificação desse produto (MAITI *et al.*, 2016).

A vantagem da utilização de bactérias do gênero *Clostridium sp.* se encontra em sua capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono como hexoses (glicose, frutose, manose, sucrose, lactose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose). Além do glicerol e fontes de amido sem a necessidade de hidrólise dos polímeros. No entanto, o butanol gerado é tóxico para o *Clostridium sp.* (LIN *et al.*, 2015; PEREIRA; NEVES, 2016).

De acordo com Tummala *et al.* (2003) pelo fato de a bactéria não ser capaz de tolerar elevadas concentrações de butanol no meio, técnicas de engenharia genética, têm sido empregadas ambicionando estudar e alterar microrganismos em relação aos aspectos-chaves de seu metabolismo, como mecanismos de transporte de açúcar, regulação da geração de butanol, tolerância ao butanol, inibição pelos subprodutos de degradação e produção de enzimas que atuam em etapas específicas da reação.

A seleção de uma cepa microbiana capaz de produzir enzimas hidrolíticas e converter biomassa em altas concentrações de etanol e/ou butanol ainda é um grande desafio (PAULOVA *et al.*, 2015). Duas alternativas podem ser seguidas para a obtenção de microrganismos adequados: a primeira envolve a adaptação de organismos naturalmente produtores de bioálcoois a fim de torná-los capazes de produzir também celulases e hemicelulases; e a segunda segue o caminho oposto, ou seja, modifica excelentes produtores de celulases e hemicelulases para também serem eficientes produtores de bioálcoois (SILVA, 2010).

Biomassas lignocelulósicas para a produção do biobutanol

Para que se tenha melhor compreensão da importância da biomassa lignocelulósica, é essencial que se compreenda a definição da mesma. Em linhas gerais, o termo se refere à matéria-prima renovável e de origem vegetal, proveniente de muitas atividades agrícolas, florestais e resíduos sólidos de algumas indústrias.

Revela-se como insumo de baixo custo e tendo em sua composição três grandes frações poliméricas importantes como: a celulose, a hemicelulose e a lignina, sendo as duas primeiras passíveis à fermentação alcoólica para a produção de bioálcool (PRATTO, 2019).

Os grandes desafios da conversão de lignocelulósicos à bioálcool podem ser listados em: natureza resistente da biomassa à degradação; variedade de açúcares que são liberados durante a hidrólise e microrganismos que sejam capazes de fermentar esses açúcares de forma eficiente (BALAT, 2011).

Selecionar os substratos lignocelulósicos adequados desempenha um papel crucial para a produção econômica de combustíveis líquidos. As condições como a disponibilidade de matéria-prima, presença de grande quantidade de carboidratos e custos de logística são fundamentais para a produção de biocombustíveis viáveis em larga escala (SILVA *et al.*, 2012).

Constituição e pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos

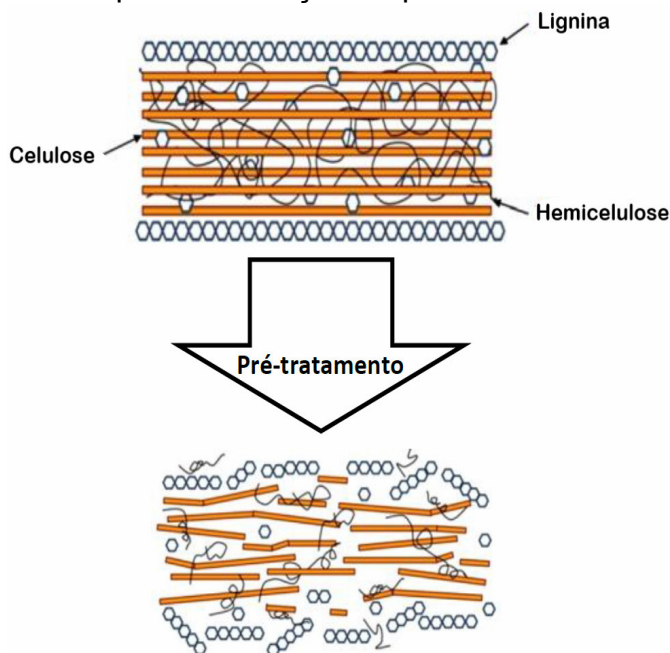
Via de regra, os materiais lignocelulósicos são constituídos, essencialmente, por três componentes: celulose (30-50 %), hemicelulose (15-35 %) e lignina (10-25 %) (LIMAYEM; RICKE, 2012), podendo variar a proporção de cada constituinte de acordo com a espécie vegetal, aspectos climáticos e de solo onde foi cultivada. As fibras de celulose estão ligadas por uma série de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Essa configuração confere rigidez e resistência às cadeias de celulose. Portanto, a celulose é insolúvel em água e a maioria dos solventes orgânicos (MOOD *et al.*, 2013).

A celulose é um polissacarídeo constituído por cadeias monoméricas de glicose, unidas entre si por ligações glicosídicas β (1-4), as quais se ligam pelos grupos hidroxilas pela eliminação de uma molécula de água). Já as hemiceluloses, diferentemente das celulosas, são formadas pela combinação de diversos tipos de monossacarídeos, chamados de heteropolissacarídeos (PITARELO, 2007)

Em relação à celulose, as hemiceluloses apresentam maior solubilidade em água. A lignina, depois da celulose, é o polímero mais abundante de origem vegetal. Está situada mais externamente na parede celular de uma planta possui características como conferir rigidez, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano (PRATTO, 2019).

As tecnologias de pré-tratamento possuem o objetivo de aumentar a acessibilidade das enzimas à biomassa e os rendimentos de açúcares fermentáveis. Vários métodos de pré-tratamentos têm sido desenvolvidos, aos quais pode-se destacar o pré-tratamento físico, tais como: extrusão e moagem; pré-tratamentos químicos, incluindo o pré-tratamento ácido e alcalino; pré-tratamentos biológicos através do uso de microrganismos; e os pré-tratamentos físico-químicos (AITA *et al.*, 2011). Na Figura 4, pode ser observado o processo de liberação dos componentes da biomassa após realizado pré-tratamento.

FIGURA 4 - Estrutura do material lignocelulósico antes e após a realização do pré-tratamento.



Fonte: Campos (2017).

A produção de bioálcool a partir de biomassa lignocelulósica é limitada devido à sua composição, estrutura e teor de lignina e hemicelulose. A celulose e hemicelulose são polissacarídeos passíveis de fermentação alcoólica, já a lignina, por não ser formada por monômeros de açúcares, não pode ser convertida em bioálcool. Logo, torna-se necessário o pré-tratamento deste material, com o propósito de modificar a estrutura cristalina e remover as estruturas ligadas à celulose, aumentando a acessibilidade das enzimas celulolíticas à mesma (PHITSUWAN *et al.*, 2016).

É importante destacar, que para o pré-tratamento, visando à produção de bioálcool, ser considerado eficiente e economicamente viável, deverá apresentar algumas características como: evitar a degradação dos carboidratos, evitar a formação de produtos inibitórios prejudiciais aos microrganismos de fermentação, removem a lignina da matriz lignocelulósica e tornar a celulose altamente digerível aos agentes hidrolíticos na etapa de hidrólise (LYND *et al.*, 1999; SUN; CHENG, 2002; MOOD *et al.*, 2013). Após o pré-tratamento do material lignocelulósico, as próximas etapas para a obtenção de bioálcool são: a hidrólise enzimática e a fermentação que podem ocorrer em separado ou simultaneamente (SANTOS *et al.*, 2010).

Hidrólise dos materiais lignocelulósicos

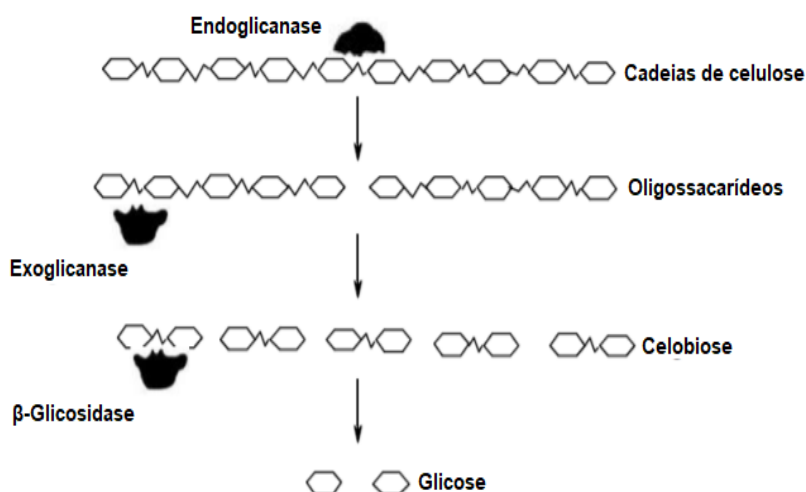
A hidrólise é o processo responsável por converter os glicídios gerados no pré-tratamento em açúcares mais simples e passíveis de fermentação. Ocorre a quebra das ligações glicosídicas e de hidrogênio, presentes na hemicelulose e celulose, reduzindo-as a pentoses e hexoses. Os processos de hidrólise podem ser ácidos ou enzimáticos. O primeiro ocorre mais rapidamente que as reações enzimáticas. No entanto, em comparação com a hidrólise ácida, reações enzimáticas operam em condições mais brandas de pH e temperatura, além de não

formar subprodutos tóxicos e inibitórios aos microrganismos da fermentação (PRATTO, 2019).

Para degradar a celulose, é necessário um complexo enzimático, que é formado por um conjunto de pelo menos três grandes grupos de celulases: as endoglicanases, as exoglicanases ou as celobiohidrolases e as β -glicosidases (BINOD *et al.*, 2011).

A hidrólise é iniciada pelas enzimas endoglicanases, que atacam as regiões amorfas da fibra celulósica, liberando os oligossacarídeos com terminais redutores e não-redutores. Enquanto as exoglicanases promovem a liberação de celobiose a partir dos terminais redutores e não-redutores. Já as β -glicosidases são responsáveis por hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis a glicose (PRATTO, 2019). Na Figura 5 pode ser observado o mecanismo de ação das celulases na cadeia de celulose.

FIGURA 5 - Representação esquemática da ação das celulases sobre a celulose



Fonte: Adaptado de Wright *et al.* (1988).

As celulases normalmente sofrem inibição pelos seus produtos de hidrólise. Os inibidores são espécies que interagem com as enzimas, incapacitando-as de catalisar a reação. A celobiose, glicose e xilose inibem as celulases e xilanases, de modo que a velocidade da reação de hidrólise é progressivamente reduzida quando esses açúcares se acumulam no meio reacional. Assim, uma das alternativas para mitigar esse efeito é suplementar o complexo enzimático com β -glicosidase, com o objetivo de promover um maior consumo de celobiose no meio reacional. Outra opção é a remoção dos açúcares ao passo que são formados durante a hidrólise (PRATTO, 2015).

Para a hidrólise da hemicelulose um grupo de enzimas chamado xilanases entra em ação. São semelhantes às celulases, porém as xilanases são compostas por um conjunto de várias enzimas com especificidades diferentes. A completa degradação da hemicelulose requer a ação das seguintes enzimas: endo- β -(1,4)-xilanases, que clivam aleatoriamente as ligações glicosídicas da cadeia principal de hemicelulose liberando os xilooligosacarídeos. Em seguida, as β -xilosidases atuam sobre a extremidade não redutora dos xilooligômeros liberando os monômeros de xilose (BINOD *et al.*, 2011).

Hidrólise e Fermentação Separadas

Diante do fato de que a hidrólise enzimática e a fermentação podem ocorrer em separado ou simultaneamente, diferentes configurações e estratégias têm sido estudadas a fim de encontrar aquela que seja mais eficiente. Quando a hidrólise ocorre sequencialmente à fermentação a operação é designada de *Separated Hydrolysis and Fermentation* (SHF). No processo SHF, os polissacarídeos são primeiramente hidrolisados a açúcares fermentáveis e, posteriormente, estes são conduzidos a reatores de fermentação onde o álcool será produzido. A vantagem do processo SHF em separado é que as temperaturas da hidrólise enzimática e da fermentação podem ser otimizadas (OGEDA; PETRI, 2010).

Diante do fato de que as enzimas utilizadas na hidrólise enzimática são suscetíveis à inibição pelos seus produtos, a velocidade de reação de hidrólise é progressivamente reduzida quando esses açúcares se acumulam no meio reacional. Esse efeito acontece especialmente quando é processada alta carga de biomassa, uma vez que maiores concentrações de sólidos conduzem à elevadas concentrações de açúcar no hidrolisado. Processar altas cargas iniciais de biomassa leva a uma redução de água livre do sistema, resultando em meios reacionais com alta viscosidade (HUANG *et al.*, 2011; MODENBACH; NOKES, 2013). Depois, no modo SHF, glicose e xilose produzidas durante a hidrólise devem ser (separadas da fração sólida, o que geralmente leva à certa perda destes açúcares (OLOFSSON *et al.*, 2008).

Sacarificação e Fermentação Simultâneas

A sacarificação ou hidrólise e fermentação simultâneas denominadas de *Simultaneous Saccharification and Fermentation* (SSF) é uma forma de evitar a inibição enzimática, uma vez que à medida que a glicose está sendo formada, também está sendo consumida para a produção de bioálcool, levando a maior conversão de celulose (SANTOS *et al.*, 2010).

Enquanto as enzimas hidrolisam os polissacarídeos, os microrganismos rapidamente consomem os açúcares fermentescíveis e os transformam em álcool (SUN; CHENG, 2002; OLOFSSON *et al.*, 2008). Em muitos casos, a inibição das celulasas por álcool também ocorre, entretanto de forma menos acentuada quando comparada com as inibições por açúcares (BINOD *et al.*, 2011).

Embora a temperatura do processo SSF tenha que ser reduzida abaixo do ótimo, o desempenho é melhor em termos de taxas, rendimentos e concentrações de etanol do que na hidrólise separada as altas temperaturas que são ótimas para a hidrólise das moléculas de celulose. A temperatura de hidrólise enzimática é tipicamente superior à da fermentação, de modo que a temperatura SSF é ajustada em condições ideais para o microrganismo durante a fermentação (OGEDA; PETRI, 2010). Assim, no processo SSF, a velocidade de produção de álcool é controlada pela velocidade de hidrólise da celulose. No entanto, já existem estudos que relatam o uso de microrganismos termotolerantes, os quais são capazes de crescer e produzir concentrações satisfatórias de etanol ou butanol em temperaturas entre 40°C e 50°C (BEGUM; DAHMAN, 2015; CHOUDHARY *et al.*, 2016).

Operação em modo batelada e batelada alimentada

É o processo mais tradicional, consistindo basicamente em um vaso com agitação e outros acessórios, como camisa de aquecimento/resfriamento. O substrato e os nutrientes adicionais são carregados no reator, em concentrações

típicas de 60 a 80 g.L⁻¹. O reator é esterilizado a aproximadamente 120°C, seguido de resfriamento a 35-37°C. Este é então inoculado com os microrganismos. A condição anaeróbia do reator é mantida através da liberação de nitrogênio ou CO₂. O tempo típico para fermentação é de 48h a 72h. Ao atingir a concentração de 20 g.L⁻¹ de butanol, o crescimento celular é interrompido e a fermentação cessa. Ao final a massa celular e os outros sólidos são removidos por centrifugação, e a porção líquida é enviada para a unidade de destilação (NATALENSE, 2013).

Este processo fermentativo é empregado normalmente quando a concentração de substrato é tóxica aos microrganismos. O reator é iniciado no modo batelada com baixa concentração de substrato. Conforme o substrato é consumido, são realizadas cargas adicionais mantendo o nível abaixo da concentração tóxica. No caso da fermentação ABE, este processo tem sido utilizado em conjunto com a retirada de solventes (NATALENSE, 2013).

A alta viscosidade durante a hidrólise representa desafios mecânicos relacionados à mistura e consumo de potência (CORRÊA *et al.*, 2016) (CORRÊA *et al.*, 2016), ocasionando limitações de transferência de calor e massa que dificultam o desempenho ideal e a distribuição uniforme das enzimas, respectivamente (FOCKINK *et al.*, 2017).

Estratégias que empregam a operação em modo batelada alimentada são bastante interessantes, pois reduzem a carga inicial de substrato e melhoram a transferência de calor e massa, promovendo reações de hidrólise e fermentação mais rápida e eficiente. No entanto, para obter resultados satisfatórios em processos operando em batelada alimentada é essencial definir um perfil de alimentação de substrato baseado em critérios racionais (PRATTO, 2019).

Operação em modo fermentação contínua

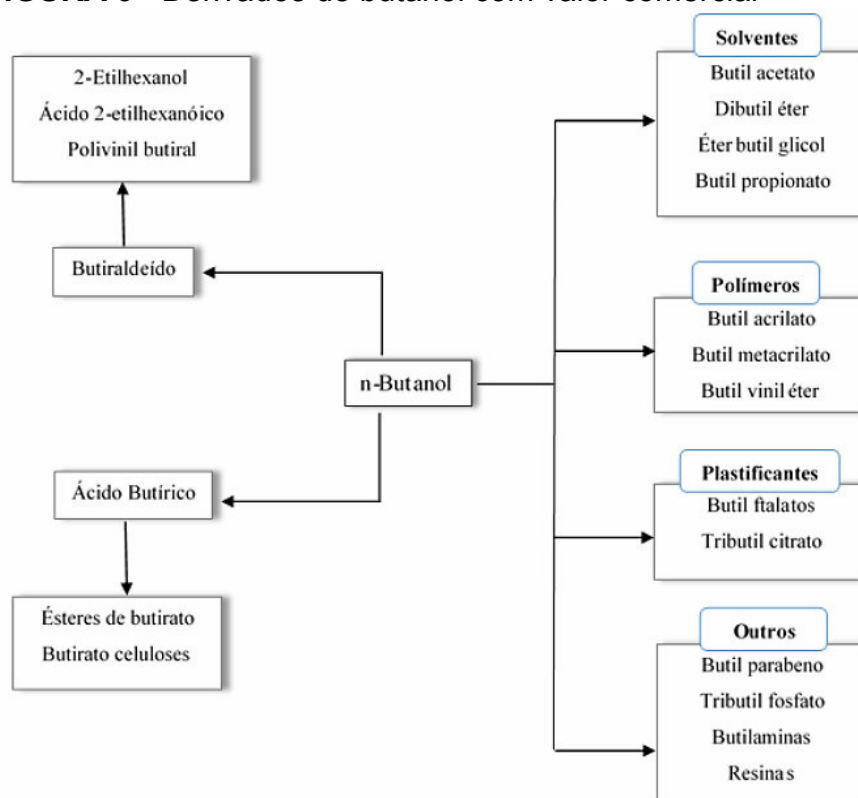
A fermentação contínua consiste em um reator que pode ser empregado um único estágio, momento em que há alimentação de substrato e retirada contínua de solvente, ou podem ser empregados uma série de reatores em vários estágios, a fim de contemplar os estágios da fermentação: acidogênese e solventogênese. Entretanto, nesse tipo de fermentação são encontradas dificuldades devido à flutuação dos níveis de produção (RANJAN; MOHOLKAR, 2012).

De acordo com Magalhães (2015), uma das linhas de pesquisa para aumentar a eficiência do processo e contornar o problema de toxicidade do butanol aos microrganismos, é a remoção contínua de solvente do meio fermentativo. Em geral, a fermentação em batelada ou batelada alimentada é mais adequada para a produção de butanol em pequenas escalas. Por outro lado, a fermentação contínua é uma boa seleção para a produção de butanol em larga escala como bicomcombustível ou produto químico a granel, devido à sua alta produtividade e menor custo de mão de obra e manutenção (XUE *et al.*, 2013).

Relevância Industrial

O n-butanol possui isômeros de importância industrial, como o 2-butanol, iso-butanol e terc-butanol, e suas distinções estruturais determinam suas propriedades físicas. Porém, esses isômeros possuem aplicações similares e podem ser utilizados, basicamente, como solventes, intermediários na fabricação de defensivos agrícolas, agentes de limpeza e aditivos para combustíveis (JIN *et al.*, 2011). Os ésteres butil acrilato e butil metacrilato são usados em revestimento de superfícies de látex, tintas e vernizes (LEE *et al.*, 2008). Na Figura 6 podem ser observados os principais derivados do n-butanol.

FIGURA 6 - Derivados de butanol com valor comercial



Fonte: Adaptado de Mascari (2012).

O principal interesse na utilização de butanol é sua aplicação como aditivo combustível. Em comparação com o etanol, o butanol possui maior conteúdo energético, menor volatilidade, maior viscosidade e facilitada distribuição devido à menor corrosividade. Também possui vantagem na partida fria, como resultado da menor temperatura de autoignição, além de apresentar menor consumo e maior autonomia do veículo. Ambos podem ser produzidos a partir de matérias-primas agroindustriais, como milho, trigo, cana-de-açúcar e mandioca. Uma planta industrial construída para a produção de bioetanol pode operar para produzir biobutanol se realizadas pequenas mudanças nas etapas de fermentação e destilação (JIN *et al.*, 2011).

Como o butanol possui correspondência com os motores a gasolina, misturas de butanol, em até 30%, na gasolina foram testadas em diferentes carros da Skoda® e não apresentaram efeitos negativos para os motores ou para o meio ambiente (PATAKOVA *et al.*, 2011; MASCAL, 2012).

Por ser proveniente do petróleo, o propano está sujeito às variações de preço de acordo com as condições do mercado, impactando diretamente no preço final do butanol. A produção biotecnológica de butanol reduziria a demanda por propano para essa finalidade, aumentando sua disponibilidade para utilização em rotas de síntese de demanda crescente, como por exemplo, a produção de prolipropileno (RIBEIRO, 2019).

Embora seja um isômero do n-butanol, o 2-butanol possui propriedades físico-químicas distintas e, por isso, sua principal aplicação não é como aditivo combustível. O 2-butanol é majoritariamente utilizado para síntese de butanona, um solvente de aplicação industrial (JIN *et al.*, 2011).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos vários pontos positivos apresentados, a utilização de butanol como combustível também possui desvantagens. Mesmo possuindo maior densidade energética que o etanol e o metanol, esse combustível possui calor de vaporização menor, o que requer aumento do fluxo de combustível no motor.

O menor índice de octanagem do butanol indica menor eficiência de combustão, que acarreta maior emissão de gases de efeito estufa por unidade de energia extraída, se comparado ao etanol. Sua maior viscosidade não é um problema para bombas de motor à diesel. No entanto, em motores de combustão interna, a alta viscosidade pode resultar em problemas de corrosão e lubrificação.

Uma das oportunidades para o Brasil seria a pesquisa do biobutanol como possível componente de misturas com diesel, já que o bioetanol não é utilizado devido às limitações de solubilidade. O biobutanol poderia ser um combustível adequado para misturas com diesel petroquímico ou mesmo biodiesel, reduzindo a demanda nacional pelo diesel importado.

Além disso, outros gargalos destacáveis do processo são: o substrato utilizado; o microrganismo escolhido; a toxicidade dos produtos e a composição do meio de cultivo. O custo da matéria-prima representa cerca de 60% do custo total da fermentação. No caso de matérias-primas lignocelulósicas, há necessidade de uma etapa de pré-tratamento que encarece o processo.

Mesmo assim, Branska *et al.* (2018) perceberam que o pH possui um papel mais importante na atenuação da viabilidade celular durante a fase clostridial do ciclo celular. Levantando uma suposição interessante de que a concentração de butanol não é, de fato, o fator causador do declínio da viabilidade celular e sim a diminuição do pH somada ao acúmulo de ácido butírico. Segundo estes autores, a produção de solventes torna-se uma alternativa para transpor a condição ácida desfavorável.

O Brasil como uma nação líder na produção de celulose de fibra curta para a produção de papel, devido à elevada produtividade do eucalipto brasileiro pode alavancar o processo de hidrólise da celulose, para integração das plantas de celulose a biorrefinarias, utilizando resíduos florestais, incluindo também a utilização de folhas e o bagaço de cana para destinação à fabricação de biocombustíveis. Hoje o bagaço é queimado nas usinas para conversão a energia elétrica. Logo, seria possível utilizar a totalidade ou parte desta matéria prima para futura fermentação.

A partir das informações adquiridas no decorrer do processo de revisão, quanto a produção de biobutanol, observa-se que a fermentação ABE empregando biomassas lignocelulósicas como matéria prima é um grande desafio uma vez que dependendo das condições de pré-tratamento e hidrólise, o efeito sinérgico de ácidos fracos e compostos fenólicos podem ser extremamente tóxicos às bactérias do gênero *Clostridium* e assim tornar o hidrolisado pouco fermentável.

Ainda, a fabricação de biobutanol pode consistir em uma ótima oportunidade para as usinas nacionais de bioetanol diversificarem a produção, visto que estas já contam com a flexibilidade de produzir açúcar e álcool e poderiam também agregar a opção de produzir butanol. E em breve, também poderiam ter a flexibilidade de decidir entre utilizar o bagaço para produção de energia elétrica ou para produção de álcoois de segunda geração.

REFERÊNCIAS

AITA, G.A.; SALVI, D.A.; WALKER, M.S. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of dilute ammonia pretreated energy cane. **Bioresource Technology**, v. 102 (6), p. 4444–4448, 2011.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway : A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858–875, 2011.

BEGUM, S.; DAHMAN, Y. Enhanced biobutanol production using novel clostridial fusants in simultaneous saccharification and fermentation of green renewable agriculture residues. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 9, n. 5, p. 529-544, 2015.

BHATTACHARYA, T. K.; CHATTERJEE, S.; MISHRA, T. N. Performance of a constant speed CI engine on alcohol-diesel microemulsions. **Applied engineering in agriculture**, v. 20, n. 3, p. 253, 2004.

BINOD, P., JANU, K. U., SINDHU, R., PANDEY, A. Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In: **Biofuels**. Academic Press, p. 229-250 , 2011.

BRANDÃO, L. F. P. **Estudo do 1-Butanol e 2-Metil-1-propanol em misturas com a gasolina e o diesel: uma análise sob a perspectiva da especificação brasileira**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de Brasília, Brasília, p.156. 2017.

BRANSKA, B, PECHACOVA, Z; KOLEK, J.; VASYLKIVSKA, M., PATAKOVA, P. FLOW. Cytometry analysis of *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 populations exhibiting different phenotypes induced by changes in cultivation conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2018.

CAMPOS, A. O. **Avaliação do pré-tratamento alcalino na hidrólise enzimática dos resíduos da palha de carnaúba**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, p. 55, 2017.

CASCONE, R.N., Biobutanol: A Replacement for Bioethanol?, SBE SpecialSection I – Biofuels, **Society of Biological Engineering**, p. 1-9, 2009.

CHEN, Z.; LIU, J.; HAN, Z.; DU, B.; LIU, Y. *et al*;. Study on performance and emissions of a passenger-car diesel engine fueled with butanol–diesel blends. **Energy**, v. 55, p. 638-646, 2013.

CHOUDHARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Thermo tolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 82–92, 2016.

CORRÊA, L. J.; BADINO, A. C.; CRUZ, A. J. G. Mixing design for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: methodology for selection of impeller configuration.

Bioprocess and Biosystems Engineering, Berlin, v. 39, n. 2, p. 285-294, 2016.

DÜRRE, P. Biobutanol: an attractive biofuel. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 2, n. 12, p. 1525-1534, 2007.

EZEJI, T.C., QURESHI, N., BLASCHEK, P., Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors, **Current Opinion in Biotechnology**, p. 220-227, 2007.

FOCKINK, D. H.; URIO, M..B. U.; SANCHEZ, H. J.; RAMOS, P.L.. Enzymatic Hydrolysis of Steam-Treated Sugarcane Bagasse: Effect of Enzyme Loading and Substrate Total Solids on Its Fractal Kinetic Modeling and Rheological Properties. **Energy & Fuels**, v. 31, n. 6, p. 6211–6220, 15 jun. 2017.

GRIMMLER, C., JANSSEN, H., KRAUBE, D., FISCHER, R. J., BAHL, H., DÜRRE, P., EHRENREICH, A. Genome-wide gene expression analysis of the switch between acidogenesis and solventogenesis in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2011.

HUFFER, S.; CLARK, M.E.; NING, J.C.; BLANCH, H.W.; CLARK, D.S. Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6400-6408, 2011.

HUANG, H.J.; RAMASWAMY, S.; LIU, Y. Bioconversion of Lignocellulose into Bioethanol: Process Intensification and Mechanism Research. **Bio Energy Research**, v. 4, n. 4, p. 225–245, 3 dez., 2011.

HUANG, H.J.; RAMASWAMY, S.; LIU, Y. Separation and purification of biobutanol during bioconversion of biomass. **Separation and Purification technology**, v. 132, p. 513-540, 2014.

JIN, C., YAO, M., LIU, H., CHIA-FON, F. L., JI, J. Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 15, n. 8, p. 4080-4106, 2011.

KANNO, M.; KATAYAMA, T.; TAMAKI, H.; MITANI, Y.; MENG, X.; *et al.* Isolation of butanol- and isobutanol-tolerant bacteria and physiological characterization of their butanol tolerance. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, n. 22, p. 6998-7005, 2013.

KNOSHAUG, E. P.; ZHANG, M. Butanol tolerance in a selection of microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, n. 1–3, p. 13–20, 2009. DOI: 10.1007/s12010-008-8460-4.

KÖPKE, M.; DÜRRE, P. Biochemical production of biobutanol. **Wood head Publishing Limited**, 2011.

LEE, J.M., SUBRAMANI, S., LEE, Y.S., KIM, J.H. "Thermal decomposition behavior of blocked diisocyanates derived from mixture of blocking agents", **Macromolecular Research**, v. 13, pp. 427-434, 2005.

LEE, S. Y., PARK, J. H., JANG, S. H., NIELSEN, L. K., KIM, J., JUNG, K. S. Fermentative butanol production by clostridia. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 209–228, 2008.

LEE, S. M., CHO, M. O., UM, Y., SANG, B. I. Development of Real-Time PCR primer and probe sets for detecting degenerated and non-degenerated forms of the butanol-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 75-83, 2010.

LEMES, J.F.; SOUZA, A. C. C. DE. Análise preliminar do uso do biobutanol como combustível. **ENEPEX (Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão)**, 2014.

LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production: Current Perspectives, Potential Issues and Future Prospects. **Progress in Energy & Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>

LIN, D. S., YEN, H. W., KAO, W. C., CHENG, C. L., CHEN, W. M.; *et al.* Bio-butanol production from glycerol with *Clostridium pasteurianum* CH₄: the effects of buty rate addition and in situ butanol removal via membrane distillation. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. 1, p. 168, 2015.

LYND, L.R.; WYMAN, C. E.; GERNGROSS, T. U. Biocommodity Engineering **Biotechnol. Prog.** v.15, p. 777–793, 1999.

MAGALHÃES, B. **Otimização da produção de butanol por cepas de *Clostridium spp.* Utilizando hidrolisado lignocelulósico.** Tese (mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, p. 93. 2015.

MAITI, S., GALLASTEG, G., SARMA, S. J., BRAR, S. K., LE BIHAN, Y., DROGUI, P., VERMA, M. A. Re-look at the biochemical strategies to enhance butanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 94, p. 187–200, 2016.

MASCAL, M. Chemicals from biobutanol: technologies and markets. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 4, p. 483–493, 2012.

MASIERO, S. S.; TRIERWEILER, L. F.; TRIERWEILER, J. O. Produção de butanol por *Clostridium acetobutylicum*. **Seminário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.** Resumos e artigos [recurso eletrônico]. Porto Alegre, RS: UFRGS/EE/PPGEQ, p. 1-7, 2011.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review: **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526–544, 2013.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G.S.; NAJAFI, G.

H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77-93, 2013.

NATALENSE, J. C. **Prospecção tecnológica do biobutanol no contexto brasileiro de biocombustíveis**, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2013.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feed stocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 7, 2008.

PANITZ, J. C.; ZVERLOV, V.V.; PHAM, V.T.T.; STURZL, S.; SCHIEDER; SCHWARZ, W.H. Isolation of a solventogenic *Clostridium sp.* strain: Fermentation of glycerol to n-butanol, analysis of the superoperon region and its potential regulatory elements. **Systematic and applied microbiology**, v. 37, n. 1, p. 1-9, 2014.

PATAKOVA, P.; MAXA, D.; RYCHTERA, M.; LINHOVA, M.; FRIBERT, P.; MUZIKOVA, Z.; MELZUCH, K. Perspectives of Biobutanol Production and Use. **Biofuel's Engineering Process Technology**, p. 243–266, 2011.

PAULOVA, L.; PATAKOVA, P.; BRANSKA, B.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K.; *et al.* Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1091–1107, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.002>.

PEITER, G. C., ALVES, H. J., SEQUINEL, R., & BAUTITZ, I. R. Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. **Revista brasileira de energias renováveis**, v. 5, n. 4, p. 519-537, 2016.

PEREIRA, E. L.; NEVES, THALITA, C. Produção biotecnológica de butanol. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 777-799, 2016.

PHITSUWAN, P.; SAKKA, K.; RATANAKHANOKCHAI, K. Structural changes and enzymatic response of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) stem induced by alkaline pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 218, p.247-256, 2016.

PRATTO, B. **Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar: estudo cinético e modelagem matemática semi-mecanística**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p.130. 2015.

PRATTO, B. **Estudo da produção de bioetanol e biobutanol a partir da palha de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p.138. 2019.

RANJAN, A; MOHOLKAR, V.S. Biobutanol: science, engineering, and economics.

Int. J. Energy Res, p. 277- 323, 2012.

RIBEIRO, L. C. P. **Produção de butanol por *Clostridium beijerinckii* NRRL B 598 a partir de coprodutos agroindustriais.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p.98, 2019.

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorrefinaria: a usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química nova**, v. 34, n. 7, p. 1242-1254, 2011.

SANTOS, J. R. A. DOS; SOUTO-MAIOR, A.M.; RIBEIRO, E.. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

Neumara Luci Conceição Silva

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) –Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

SILVIO, S. S.; SILVIO, S.; CHANDEL, A. K., WICKRAMASINGHE, S. R., DOMÍNGUEZ, J. M. Fermentative production of value-added products from lignocellulosic biomass. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Nov 26, p. 107, 2012. DOI:10.1155/2012/826162 .

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

TORNATORE, C., MARCHITTO, L., VALENTINO, G., CORCIONE, F. E., &MEROLA, S. S. Optical diagnostics of the combustion process in a PFI SI boost edengine fue led with butanol–gasoline blend. **Energy**, v. 45, n. 1, p. 277-287, 2012.

TUMMALA, S. B., JUNNE, S. G., PAREDES, C. J., & PAPOUTSAKIS, E. T. Transcription alanalysis of product concentration drive changes in cellular program sofrecombinant *Clostridium acetobutylicum* strains. **Biotechnology and bioengineering**, v. 84, n. 7, p. 842-854, 2003.

UYTTEBROEK, M.; VAN HECKE, W.; VANBROEKHOVEN, K. Sustainability metrics of 1-butanol. **Catalysis Today**, v. 239, p. 7-10, 2015.

VISIOLI, L. J., ALVES, E., TRINDADE, A., KHUN, R., SCHWAAB, M., & MAZUTTI, M. Avaliação da produção biotecnológica de butanol a partir de sorgo sacaríneo. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2678-2685, 2015.

WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROCHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Processe valuation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 75-90, 1988.

XUE, C., ZHAO, X. Q., LIU, C. G., CHEN, L. J.; BAI, F. W. Prospective and development of butanol as advanced biofuel. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1575-1584, 2013.