

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

GISLENE MOTA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DE
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO UTILIZANDO
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE
ETANOL 2G**

SÃO CARLOS – SP

2015

GISLENE MOTA DA SILVA

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DE HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz

SÃO CARLOS – SP

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

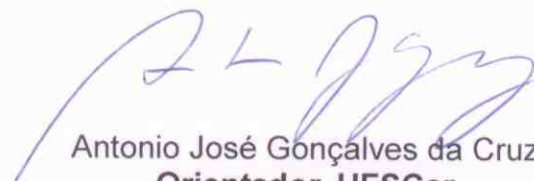
S586a Silva, Gislene Mota da
Avaliação de diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol 2G / Gislene Mota da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
125 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Pré-tratamento hidrotérmico. 3. Conversão enzimática. 4. Fermentação. 5. Etanol 2G. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE GISLENE MOTA DA SILVA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 27 DE MARÇO DE 2015.

BANCA EXAMINADORA:



Antonio José Gonçalves da Cruz
Orientador, UFSCar



Janaina Fernandes Gomes
UFSCar



Sandra Cerqueira Pereira
EMBRAPA



Ursula Fabiola Rodriguez Zúñiga
UNIMEP



Rosineide Gomes da Silva Cruz
UFSCar

*Esse trabalho é dedicado a toda
minha família que sempre me
apoiou.*

AGRADECIMENTOS

A minha família, minha mãe Janildes, meu pai Lourival, minha querida irmã Gerusa e meu cunhado Leandro que sempre me incentivaram e me apoiaram ao longo da realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz pela orientação, conselhos, paciência e grande amizade ao longo desses últimos seis anos. A professora Dr. Raquel de Lima Camargo Giordano pelos conselhos e apoio para a melhoria do doutorado.

Aos amigos dos Laboratórios: Geral, Controle, Tecnologia Enzimática e Simulação.
Agradeço a todos, pelo companheirismo e amizade.

Ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar por tornar possível a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro para a realização do curso de doutorado.

Ao projeto temático BIOEN - FAPESP pelo apoio financeiro.

A Capes pelo apoio financeiro no estágio realizado no Departamento de Engenharia de Biosistemas e Agricultura da Universidade Estadual de Oklahoma (OSU), Stillwater, OK, EUA.

Ao professor Dr. Mark R. Wilkins pela supervisão do estágio realizado na OSU. Aos Drs. Karthikeyan Ramachandriya e Amit Kanchi pelo apoio no desenvolvimento do doutorado. As famílias Marvin e Holloway-wanger pelo grande carinho que tiveram comigo durante minha estadia nos EUA. E ao meu grande amigo Anserd Foster pelo companheirismo e apoio.

E a todas as outras pessoas que de maneira direta ou indiretamente colaboraram para a elaboração desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Confie em Deus e nos seus valores. Persista no bom sentido, levante a bandeira do otimismo e da fé. Ame! E com toda certeza será feliz!

Lourival Lopes.

SILVA, G. M. **AValiação de diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação utilizando o bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol 2G.** 2015. 125 p. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

RESUMO

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é um subproduto gerado após a moagem da cana-de-açúcar no processo de produção de açúcar e/ou etanol. No presente trabalho, o BCA pré-tratado foi utilizado em diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação com o objetivo de obter a maior quantidade de açúcares fermentescíveis na sacarificação e convertê-los a etanol. O BCA foi pré-tratado hidrotêrmicamente na proporção 1:10 (m/v) nas condições 170 °C/15 min, 195 °C/10 min e 195 °C/60 min com agitação de 200 rpm. A etapa de deslignificação do BCA pré-tratado hidrotêrmicamente foi realizada com 0,02 e 0,5% de solução de NaOH na proporção 1:10 (m/v). Amostras de BCA pré-tratada e não tratada foram caracterizadas quimicamente e morfologicamente. Os primeiros ensaios de hidrólise enzimática e fermentação foram realizados na configuração PSSF (pré-sacarificação e fermentação simultâneas). Na melhor condição (10% de BCA tratado a 195 °C/10 min) foi obtido rendimento em etanol de 57,5%. Os experimentos de SSF (sacarificação e fermentação simultâneas) foram realizados em frascos de Erlenmeyers com agitação de 250 rpm a 37 °C com levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial por 72 h. Nos primeiros ensaios avaliou-se o efeito do meio inicial tamponado e não tamponado para os BCAs pré-tratados hidrotêrmicamente. No melhor resultado obteve-se 53,8% de conversão enzimática e concentração de etanol de 17,1 g/L (BCA tratado a 195 °C/10 min em meio tamponado). Nos ensaios seguintes, avaliou-se o efeito da carga de sólidos (10 e 15%) para amostras de BCA deslignificada e não deslignificada utilizando carga enzimática de 20 FPU/g BCA tratado. Nesses ensaios obteve-se máximos rendimentos em etanol de 53,8 e 60,0% e concentrações de etanol 17,1 e 28,4 g/L com 10 e 15% de BCA, respectivamente. Esses resultados mostraram que o aumento na carga de sólidos favoreceu o aumento no rendimento em etanol. Nos ensaios em configuração SHF (sacarificação e fermentação separadas) utilizando amostras de BCA deslignificada e não deslignificada obteve-se concentração de etanol de 39,9 g/L e rendimento em etanol de 84,0% com 15% de sólidos em 72 h. Ensaios nas configurações 10% BCA/15 FPU/g BCA tratado, 10% BCA/30 FPU/g BCA tratado, 15% BCA/15 FPU/g BCA tratado e 15% BCA/30 FPU/g BCA tratado foram realizados empregando as leveduras *Kluyveromyces marxianus* IMB3 e *Saccharomyces cerevisiae* D₅A na produção de etanol a partir do BCA pré-tratado hidrotêrmicamente. Os resultados mostraram conversão enzimática de 64,3% e concentração máxima de etanol de 29,2 g/L utilizando 15% de sólidos em 72 h para IMB3. Para a levedura D₅A obteve-se rendimento em etanol de 76,2% e a máxima concentração de etanol de 42,6 g/L em 120 h utilizando 15% de sólidos e 30 FPU/g BCA tratado. De modo geral, todas as condições avaliadas apresentaram resultados satisfatórios na obtenção de etanol a partir do BCA pré-tratado hidrotêrmicamente. Entretanto, cargas de substrato maiores favoreceram a configuração SHF por operar separadamente a hidrólise enzimática e a fermentação alcançando maiores rendimento em etanol nas condições avaliadas nesse trabalho.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratamento hidrotérmico, conversão enzimática, fermentação, etanol 2G.

SILVA, G. M. **EVALUATION OF DIFFERENT CONFIGURATIONS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS AND FERMENTATION USING SUGARCANE BAGASSE FOR 2G ETHANOL PRODUCTION**. 2015. 125 p. Doctoral thesis. Chemical Engineering Graduate Program, Federal University of São Carlos, São Carlos, 2015.

ABSTRACT

Sugarcane bagasse (SCB) is a by-product generated after sugarcane milling in the process of manufacture of sugar and/or ethanol. In this study, pretreated SCB was used in different configurations of enzymatic hydrolysis and fermentation. The objective was obtaining the greatest amounts of fermentable sugars in the enzymatic conversion and then converted them to ethanol. SCB was hydrothermally pretreated (1:10 (w/v), solid-liquid ratio) under the conditions 170 °C/15 min, 195 °C/10 min, and 195 °C/60 min at 200 rpm. The delignification step of the hydrothermal pretreated SCB was carried out with 0.02 and 0.5% NaOH solution at 1:10 (w/v). Pretreated and untreated samples of SCB were chemical and morphologically characterized. Enzymatic hydrolysis and fermentation assays were carried out in PSSF (pre-saccharification prior to simultaneous saccharification and fermentation) process. In the best condition, (10% pretreated SCB at 195 °C/10 min) it was obtained 57.4% of ethanol yield. SSF (simultaneous saccharification and fermentation) experiments were performed in Erlenmeyer flasks at 250 rpm and at 37 °C using commercial *Saccharomyces cerevisiae* during 72 h. In the first assay, it was evaluated the effect of initial buffered medium and non-buffered medium for hydrothermal pretreated SCBs. In the best result, it was obtained 53.8% of enzymatic conversion and an ethanol titer of 17.1 g/L (SCB pretreated at 195 °C/10 min in buffered medium). In the next assays, it was evaluated the effect of solid loading (10 and 15%) on delignified and non-delignified SCB using an enzyme loading of 20 FPU/g pretreated SCB. In these assays were obtained ethanol yields of 53.8 (17.1 g/L) and 60.0% (28.4 g/L) for 10 and 15% of SCB, respectively. These results showed that the increased in solid loading favored obtaining higher ethanol yield. Assays in SHF configuration (separate hydrolysis and fermentation) using delignified and non-delignified samples of SCB achieve ethanol concentration of 39.9 g/L and ethanol yield was 84% with 15% loading at 72 h. Other experiments were carried out in 10% SCB/15 FPU/g SCB loading, 10% SCB/30 FPU/g SCB loading, 15% SCB/15 FPU/g SCB loading and 15% SCB/30 FPU/g SCB loading employing the thermotolerant yeasts *Kluyveromyces marxianus* IMB3 and *Saccharomyces cerevisiae* D₅A to ethanol production from hydrothermal pretreated SCB. The results showed enzymatic conversion was 64.3% and maximum ethanol concentration of 29.2 g/L using 15% of SCB at 72 h. D₅A yeast showed ethanol yield was 76.2% and the maximum ethanol concentration of 42.6 g/L at 120 h using 15% of solid load and 30 FPU/g SCB of enzyme load. Overall, all evaluated conditions showing satisfactory results in obtaining ethanol from hydrothermal pretreated SCB. However, high concentration of substrate loading favored SHF process to operate separately enzymatic hydrolysis and fermentation. This configuration achieved high ethanol yields in the conditions assessed in this work.

Keywords: Sugarcane bagasse, hydrothermal pretreatment, enzymatic conversion, fermentation, 2G ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da colheita mecanizada da cana-de-açúcar na safra 2012.	6
Figura 2. Diagrama do catabolismo da glicose em células de <i>S. cerevisiae</i>	11
Figura 3. Estrutura de uma fibra vegetal.	18
Figura 4. Unidade de celobiose.	19
Figura 5. Cadeias com extremidades não redutora e redutora do polímero de celulose.	19
Figura 6. Posição das ligações inter e intramoleculares na celulose.	20
Figura 7. Regiões específicas da celulose.	21
Figura 8. Ilustração das várias escalas de porosidade a partir do lúmen celular.	22
Figura 9. Estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.	24
Figura 10. Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de <i>Fagus sp.</i>	26
Figura 11. Estrutura química dos precursores da lignina.	27
Figura 12. MEV (microscopia eletrônica de varredura) – Imagem da pseudo-lignina depositada na superfície de <i>Poplar</i> holocelulose após pré-tratamento com ácido diluído.	29
Figura 13. Modo de ação do complexo celulásico sobre a celulose.	39
Figura 14. Mecanismo de degradação da celulose por fungos.	41
Figura 15. Fluxograma das etapas envolvidas no estudo do pré-tratamento hidrotérmico das amostras de BCA <i>in natura</i>	47
Figure 16. Fluxograma da deslignificação com solução de NaOH do BCA pré-tratamento hidrotérmico a 195 °C/10 min.	48

Figura 17. Fluxograma dos experimentos realizados no laboratório ATRC.	49
Figura 18. Fotografia da amostra de BCA <i>in natura</i>	50
Figura 19. Fotografia do reator de 5,0 L Parr Instrument Company.	51
Figura 20. Fotografia do reator utilizado nos ensaios realizados no ATRC.	52
Figura 21. Rampas de aquecimento e resfriamento da etapa de pré-tratamento das amostras de BCAs tratadas, (a) 170 °C/15 min, (b) 195 °C/10 min e (c) 195 °C/60 min.	68
Figura 22. Influência do fator de severidade na liberação de ácido acético nos BCAs tratados. .	69
Figura 23. Quantidade percentual dos componentes recuperados após o pré-tratamento hidrotérmico do BCA.	70
Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura do BCA <i>in natura</i> (a), 170°C/15 min (b), 195°C/10 min (c) e 195°C/60 min (d).	72
Figura 25. Quantidade percentual dos componentes recuperados após os pré-tratamentos do BCA.	74
Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura do BCA 0,02% NaOH (a), 0,5% NaOH (b) e 0,5% NaOH magnificação de 20,000x (c).	76
Figura 27. Concentração de glicose e etanol para o BCA a 195 °C/10 min em PSSF.	77
Figura 28. Concentrações de glicose dos experimentos de SSF.	78
Figura 29. Concentrações de etanol dos experimentos de SSF.	79
Figura 30. Concentração de ácido acético nos ensaios de SSFs.	80
Figura 31. Concentração de glicose dos experimentos de SSF realizados com BCAs tratado hidrotermicamente e deslignificados com 0,02 e 0,5% de NaOH.	82

Figura 32. Concentração de etanol dos experimentos de SSF realizados com BCAs tratado hidrotêrmicamente e deslignificados com 0,02 e 0,5% de NaOH.	84
Figura 33. Concentração de ácido acético dos experimentos de SSF.....	86
Figura 34. Concentração de glicose dos ensaios de SHF realizados com BCAs tratado hidrotêrmicamente e deslignificados com 0,02 e 0,5% de NaOH.	88
Figura 35. Concentração de etanol (a) e consumo da glicose (b) nos experimentos de SHF realizados com BCAs tratado hidrotêrmicamente e deslignificados com 0,02 e 0,5% de NaOH.	90
Figura 36. Concentração de ácido acético dos experimentos de SHF realizados com BCAs tratado hidrotêrmicamente e deslignificados com 0,02 e 0,5% de NaOH.	91
Figura 37. Concentração de glicose e etanol ao longo do tempo.....	92
Figura 38. Concentração de celobiose na SSF.....	93
Figura 39. Concentração de ácido acético nos ensaios de SSF.....	95
Figura 40. Concentração de glicose dos experimentos de SSF utilizando <i>K. marxianus</i> IMB3. .	97
Figura 41. Concentração de etanol dos experimentos de SSF utilizando <i>K. marxianus</i> IMB3....	98
Figura 42. Concentração de ácido acético nos ensaios de SSF utilizando <i>K marxianus</i> IMB3. ..	99
Figura 43. Concentração de glicose dos experimentos de SSF utilizando <i>S. cerevisiae</i> D5A. ..	101
Figura 44. Concentração de etanol dos experimentos de SSF utilizando <i>S. cerevisiae</i> D5A.	102
Figura 45. Concentração de ácido acético nos ensaios de SSF com <i>S. cerevisiae</i> D5A.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporção da mistura de etanol anidro à gasolina.....	13
Tabela 2. Composição média do BCA <i>in natura</i>	16
Tabela 3. Composição química da amostra de BCA <i>in natura</i>	65
Tabela 4. Comparação da caracterização química do BCA <i>in natura</i>	66
Tabela 5. Dados do fator de severidade, pH e recuperação de sólidos dos BCAs.....	67
Tabela 6. Caracterização química dos BCAs pré-tratados hidrotermicamente.	70
Tabela 7. Recuperação de sólidos dos BCAs a 195 °C/10 min sem e com deslignificação.	73
Tabela 8. Caracterização química dos BCAs pré-tratados hidrotermicamente seguido de deslignificação com 0,02 e 0,5% de solução de NaOH.	74
Tabela 9. Dados com meio tamponado sinal (+) e meio não tamponado sinal (-) em 48 h.....	81
Tabela 10. Dados obtidos durante a SSF em 48 h.	85
Tabela 11. Dados obtidos durante a SHF.....	89
Tabela 12. Caracterização química dos BCAs.....	96
Tabela 13. Dados obtidos a partir dos ensaios de SSF em 72 h.....	99
Tabela 14. Dados obtidos a partir dos ensaios de SSF em 120 h.....	102
Tabela 15. Resumo dos processos realizados nesse projeto.	105

LISTA DE ABREVIATURAS

ANP: Agência Nacional do Petróleo

ATP: Adenosina Trifosfato

BCA: Bagaço de cana-de-açúcar

CBU/g: Cellobiase Unit per gram (Unidade de celobiose por grama)

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLC: Complexo Lignina Carboidrato

FPU/g: Filter paper Unit per gram (Unidade de papel de filtro por grama)

GP: Grau de Polimerização

HMF: Hidroximetilfurfural

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

NADH: Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo

PSSF: Pre-Sacarificação e Fermentação Simultâneas

RID: Índice de Refração

SCB: Sugarcane bagasse

SHF: Sacarificação e Fermentação Separadas

SHCF: Sacarificação e co-Fermentação Separadas

SSF: Sacarificação e Fermentação Simultâneas

SSCF: Sacarificação e co-fermentação Simultâneas

UV/Vis: Espectrofotometria de Absorção no Ultravioleta e Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	4
1.1.1 Objetivos específicos	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Cana-de-açúcar	5
2.2 Leveduras	7
2.3 Metabolismo da glicose	9
2.4 Produção de etanol	12
2.5 Materiais Lignocelulósicos.....	16
2.5.1 Fibras e fibrilas	17
2.5.2 Celulose	18
2.5.3 Hemiceluloses	23
2.5.4 Lignina.....	25
2.5.5 Extrativos	30
2.6 Pré-tratamentos	30
2.6.1. Pré-tratamento hidrotérmico	34
2.7 Hidrólises	37
2.8 Processos de hidrólise enzimática e fermentação	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 Fluxogramas do projeto	47
3.2 Bagaço de cana-de-açúcar (BCA)	50
3.3 Enzimas.....	50
3.4 Microrganismos	51
3.5 Pré-tratamento do BCA.....	51
3.5.1 Pré-tratamentos hidrotérmicos	53

3.5.2 Pré-tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação com NaOH.....	53
3.6 Caracterização química do BCA	54
3.6.1 Extrativos	54
3.6.2 Hidrólise ácida.....	54
3.6.3 Determinação da lignina solúvel	55
3.6.4 Determinação da lignina insolúvel.....	55
3.6.5 Determinações das cinzas da lignina e do BCA	56
3.6.6 Determinações de carboidratos e ácidos orgânicos.....	56
3.6.7 Determinações de hidroximetilfurfural e de furfural	57
3.7 Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	57
3.8 Hidrólise enzimática e fermentação do BCA	58
3.8.1 Preparo do inóculo	58
3.8.2 Preparo do meio de fermentação	58
3.8.3 Análises por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE)	58
3.8.4 Ensaios de pré-sacarificação e fermentação simultânea (PSSF)	60
3.8.5 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)	60
3.8.6 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) em diferentes cargas de sólidos	61
3.8.7 Sacarificação e fermentação separadas (SHF)	61
3.8.8 Comparação de enzimas em processo SSF	62
3.9 Experimentos desenvolvidos no Departamento de Engenharia de Biosistemas e Agricultura da Universidade Estadual de Oklahoma no laboratório ATRC	63
3.9.1 Pré-tratamento hidrotérmico	63
3.9.2 Preparos do inóculo e do meio de fermentação	63
3.9.3 Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)	64
3.9.4 Análises das amostras de SSF por CLAE.....	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 Caracterização do BCA <i>in natura</i>	65
4.2 Caracterização química e morfológica dos BCAs pré-tratamentos hidrotermicamente	66
4.3 Pré-tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação alcalina: caracterização química e morfológica	73

4.4 Hidrólise enzimática e fermentação do BCA	77
4.4.1 PSSF do BCA pré-tratado a 195 °C/10 min.....	77
4.4.2 SSF dos BCAs pré-tratados hidrotermicamente	78
4.4.3 SSF dos BCAs pré-tratados hidrotermicamente seguido de deslignificação alcalina.....	82
4.4.4 SHF dos BCAs pré-tratados hidrotermicamente seguido de deslignificação alcalina	87
4.4.5 SSF de comparação das enzimas Accellerase 1500 e Cellic CTec2.....	92
4.5 Experimentos realizados no Departamento de Engenharia de Biosistemas e Agricultura da Universidade Estadual de Oklahoma no laboratório ATRC.....	96
5. CONCLUSÕES	106
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
7. PUBLICAÇÃO	125

1. INTRODUÇÃO

O aquecimento global e o esgotamento dos combustíveis fósseis têm impulsionado as pesquisas em energia renovável, a fim de oferecer fontes alternativas para substituir os derivados de petróleo. Ao contrário de fontes não renováveis, a biomassa fornece a mesma possibilidade para a transformação dos derivados lignocelulósicos em produtos químicos e biocombustíveis sem aumentar o efeito estufa (Galdos et al., 2013).

No Brasil, o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar é o principal combustível substituto da gasolina, sendo empregado na forma hidratada como combustível e na forma anidra como aditivo da gasolina em motores a combustão (Martins, 2009). Novas tecnologias estão sendo desenvolvidas nas últimas décadas com perspectiva de evolução no setor da cana-de-açúcar, tais como, conversão termoquímica da biomassa, produção de biogás e integração da primeira (1G) e segunda geração (2G) da produção de etanol (Mabee e Saddler 2010; Silalertruksa e Gheewala, 2011; Leal et al., 2013; Macrelli et al., 2014; Silva et al., 2015).

A produção de etanol celulósico ou etanol de segunda geração (2G), produzido a partir dos resíduos da cana-de-açúcar, é uma das alternativas sustentáveis para obtenção de combustível renovável, portanto, de grande importância para o meio ambiente, pois diminui a emissão de gases poluentes para a atmosfera. A pesquisa sobre a conversão da biomassa lignocelulósica a combustíveis e produtos químicos têm atraído muito interesse nas últimas décadas, devido ao aumento na demanda global por energia e as preocupações crescentes com a segurança energética, desenvolvimento rural e os custos crescentes, assim como, o impacto ambiental associado com a produção química do não renovável e não degradável (Ragauskas et al., 2006; Amores et al., 2013).

Atualmente, a conversão da biomassa lignocelulósica a biocombustível é composta por cinco etapas principais: coleta da biomassa, pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e/ou destilação/retificação/desidratação, dependendo da especificação do biocombustível final. No entanto, o processo de bioconversão é significativamente prejudicado pela recalcitrância da biomassa *in natura*, que se refere às complexas características lignocelulósicas que atuam como uma proteção contra a degradação enzimática (Zhao et al., 2012; Pauly e Keegstra, 2010).

Embora os mecanismos moleculares relacionados com a recalcitrância da biomassa ainda não são completamente claros, a área superficial acessível da celulose exposta tem sido proposta como um fator particularmente importante (Foston e Ragauskas, 2012). Assim, a etapa de pré-

tratamento é requerida para tornar a biomassa mais acessível para as enzimas pela alteração das composições químicas ou físicas da estrutura da biomassa lignocelulósica (Zhao et al., 2012).

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é constituído basicamente de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polímero linear do dímero glicose-glicose (celobiose), rígido e difícil de ser hidrolisado. A sua hidrólise completa gera glicose (açúcar de seis carbonos fermentescível). A hemicelulose é constituída de cadeia principal de xilose com várias ramificações de manose, arabinose, galactose entre outras, a sua hidrólise é mais fácil que a da celulose, mas a fermentação das pentoses (açúcar de cinco carbonos) não é tão desenvolvida como a da glicose. Por fim, a lignina, não está relacionada às moléculas de açúcares simples, portanto, não é relacionada à produção de etanol por rotas fermentativas (Bioetanol, 2008; Trajano et al., 2013).

Na etapa de pré-tratamento, reduz-se a recalcitrância da biomassa, alterando as características estruturais da parede celular, de modo que as frações polissacarídeas (principalmente, celulose) bloqueadas na complexidade da parede celular da planta possam tornar-se mais acessíveis e susceptíveis a hidrólise enzimática (Yang e Wyamn, 2008).

Diferentes pré-tratamentos, dentre eles, métodos físico, químico, físico-químico e biológico têm sido desenvolvidos na tentativa de reduzir a recalcitrância e melhorar a produção dos açúcares a partir da biomassa celulósica. Dependendo das condições operacionais impostas na etapa de pré-tratamento, várias propriedades fundamentais da biomassa lignocelulósica são alteradas e acredita-se no impacto causado sobre a recalcitrância da biomassa pré-tratada, estrutura lignina-hemicelulose, cristalinidade e ultraestrutura da celulose, grau de polimerização e acessibilidade da celulose (isto é, tamanho e volume dos poros) (Hendriks e Zeeman, 2009; Pu et al., 2013; Visser et al., 2015).

O pré-tratamento hidrotérmico, também chamado de auto-hidrólise ou hidrotérmólise, nos últimos anos tem atraído grande atenção, uma vez que utiliza apenas água como solvente, sem adição de produtos químicos, reduzindo os custos dos equipamentos utilizados e dos insumos empregados. O pré-tratamento hidrotérmico tem sido descrito como um processo tecnológico “verde”, pois evita problemas de corrosão, produzindo quantidades menores de resíduos por neutralização do hidrolisado e apresenta ainda outras vantagens em relação aos demais tratamentos (Saha et al., 2013; Kumar et al., 2011).

O pré-tratamento hidrotérmico é geralmente, realizado a altas temperaturas (150 a 220 °C) sob suaves condições ácidas, que surgem, em grande parte, da liberação dos ácidos orgânicos da

biomassa lignocelulósica, diminuindo o pKa da água a medida que se eleva a temperatura (Kumar et al., 2011; Pu et al., 2013).

O processo de pré-tratamento hidrotérmico é eficaz na produção de elevados rendimentos em açúcares a partir de uma vasta gama de biomassas lignocelulósicas. O pré-tratamento hidrotérmico provoca mudança estrutural da celulose e lignina, assim como a solubilização da hemicelulose dependendo das condições operacionais, reduzindo a recalcitrância da biomassa lignocelulósica (Kumar et al., 2011; Lei et al., 2013; Pu et al., 2013).

Os processos de hidrólise enzimática da biomassa devem ser concebidos em função do tipo de substrato, do pré-tratamento utilizado, assim como, a estratégia de fermentação utilizada: sacarificação e fermentação simultânea (SSF), sacarificação e fermentação separada (SHF) e pré-sacarificação e fermentação simultâneas (PSSF) (García-aparício et al., 2011).

Tradicionalmente, os sistemas de enzimas capazes de superar a recalcitrância dos polissacarídeos, tais como a celulose, constitui-se de três principais enzimas: endoglucanases, que agem de forma randômica nas regiões amorfas da cadeia polissacarídica, exoglucanases que atuam na degradação do polímero nas extremidades da cadeia e as β -glicosidases que hidrolisam a celobiose em glicose (Dimarogona et al., 2012; Horn et al., 2012).

Portanto, a conversão da biomassa lignocelulósica em etanol tem sido considerada um caminho atrativo para o avanço do setor de biocombustíveis. As tecnologias empregadas devem ter baixo custo de pré-tratamento, hidrólise dos açúcares altamente eficaz e microrganismos fermentativos robustos (Mabee e Saddler, 2010; Oliveira et al., 2014).

Nesse contexto, o trabalho se inseriu no bojo do projeto temático “Bioprocess System Engineering (BSE) applied to the production of bioethanol from sugarcane bagasse” desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LaDABio) e Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar) com apoio financeiro do programa de bioenergia da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Bioen/FAPESP). O trabalho avaliou diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente, a fim de obter melhores conversões em glicose e converter o hidrolisado a etanol, utilizando leveduras convencionais e termotolerantes.

1.1 Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo avaliar diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. As amostras de bagaço pré-tratadas hidrotermicamente e hidrotermicamente seguida de deslignificação foram então submetidas às etapas de hidrólise enzimática e fermentação alcoólica empregando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* para a obtenção de etanol 2G.

1.1.1 Objetivos específicos

- ❖ Realizar experimentos de pré-tratamento hidrotérmico utilizando amostras de BCA *in natura* utilizando diferentes graus de severidade;
- ❖ Caracterizar quimicamente e morfológicamente (MEV) as amostras de BCA *in natura*, antes e após cada etapa de pré-tratamento, determinando a composição percentual dos seus principais constituintes: celulose, hemicelulose e lignina;
- ❖ Avaliar o efeito do meio reacional tamponado e não tamponado dos BCAs pré-tratado hidrotermicamente;
- ❖ Realizar experimentos de hidrólise enzimática com BCA pré-tratado hidrotermicamente e deslignificado utilizando diferentes cargas de sólidos;
- ❖ Avaliar diferentes configurações de fermentação utilizando os processos PSSF (pré-sacarificação e fermentação simultâneas), SSF (sacarificação e fermentação simultâneas) e SHF (sacarificação e fermentação separadas), empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- ❖ Avaliar o efeito das leveduras termotolerantes (*Kluyveromyces marxianus* IMB3 e *Saccharomyces cerevisiae* D₅A) na fermentação em diferentes cargas de sólidos e enzimática em processo SSF.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar tem sua origem no sudeste asiático e pertence à família das angiospermas, a *Poaceae*. São herbáceas, perene, com nós (de onde saem as gemas) e entrenós, epiderme característica, raiz fasciculada e flores monóclinas. As folhas da cana-de-açúcar são alternas ou opostas, possuem nervuras paralelinérveas e bainhas largas, são lineares e podem chegar a 140 centímetros de comprimento. O seu fruto é bem pequeno, do tipo cariopse. Dentre seus constituintes estão a sacarose, as fibras, o ácido ascórbico, o ácido hidrocianico e sais minerais (Moreira et al., 2008).

A exploração canavieira no início foi baseada na espécie *Saccharomyces officinarum*, mas com o surgimento de doenças houve a necessidade do cruzamento da *S. officinarum* com as quatro outras espécies do gênero *Saccharum* e, posteriormente, através de recruzamento com as ascendentes. A cana-de-açúcar tem inúmeras aplicações podendo ser empregada *in natura*, sob a forma de forragem, para alimentação animal ou como matéria-prima para a fabricação de aguardente, melado, açúcar e etanol (Bioetanol, 2008).

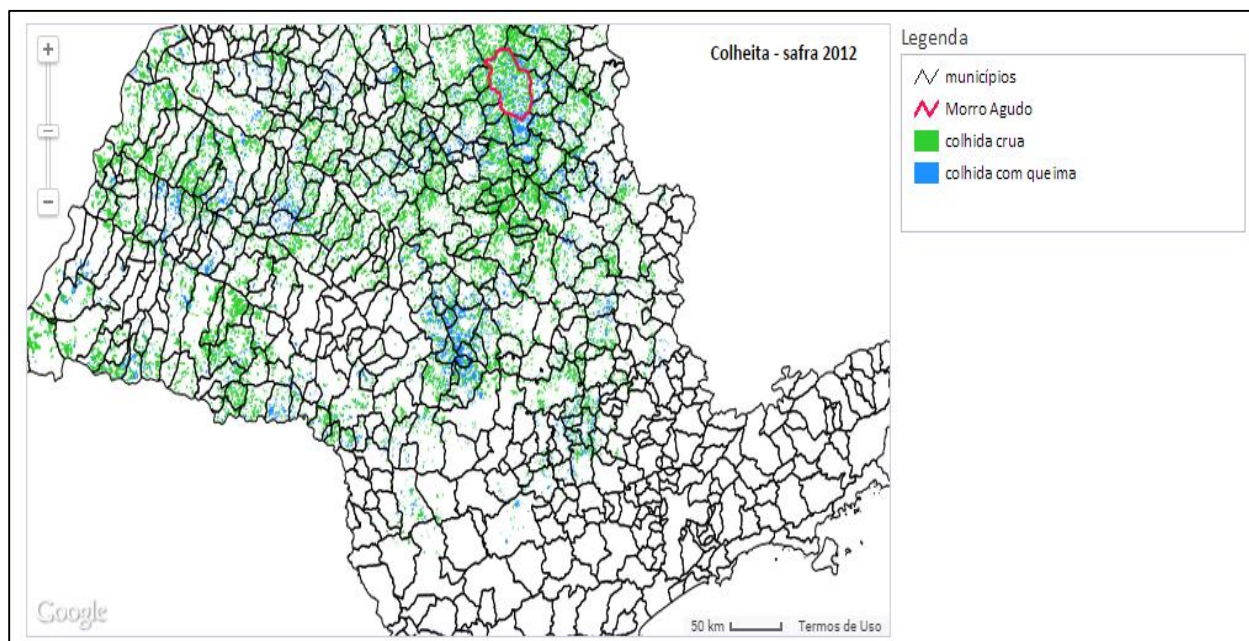
No Brasil, a cana-de-açúcar foi trazida pelos portugueses na primeira década do século XVI, sendo desenvolvida com sucesso no nordeste brasileiro, principalmente, nas faixas litorâneas. O Brasil tornou-se o principal produtor e exportador de açúcar nos séculos XVI e XVII. A cana-de-açúcar tem um significado importante nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, especialmente, devido a produção de açúcar e etanol. Recentemente a cultura de cana-de-açúcar tem atraído interesse global como matéria-prima para a produção de energia, uma vez que apresenta saldo de energia positivo (Macedo et al., 2008; Renouf et al., 2008; Smeets et al., 2009).

No Brasil, com o avanço da colheita mecanizada da cana, sem queima prévia, uma parte substancial dos resíduos da cana, composto por ponteiros da planta e folhas secas são deixados sobre o solo, gerando um resíduo industrial de cana-de-açúcar. Antigamente, a forma mais comum de retirar esse resíduo de cana-de-açúcar era amontoar e queimar essa biomassa no campo, a fim de manter as práticas de cultivos das soqueiras. Com o acúmulo desse resíduo no campo, a experiência fez com que muitos agricultores deixassem esse resíduo da cana-de-açúcar no solo,

visando, principalmente, a conservação do solo e da água (Trivelin et al., 1995; Vitti et al., 2011; Franco et al.; 2013).

Em 2012, cerca de 85% da cana-de-açúcar foi colhida mecanicamente no estado de São Paulo (Figura 1). No município de Morro Agudo cerca de 59 mil ha foram colhidos mecanicamente e aproximadamente, 29 mil ha da cana-de-açúcar foram colhidas manualmente com a queima do canavial. Recentemente, um grupo significativo de empresas começaram a considerar o uso alternativo dos resíduos da colheita, que podem representar entre 10 a 30 toneladas/ha/ano de biomassa seca, dependendo do rendimento da cana-de-açúcar (Canasat, 2012; Fortes et al., 2012).

Figura 1. Mapa da colheita mecanizada da cana-de-açúcar na safra 2012.



Fonte: Adaptado de Canasat, 2012.

O colmo (caule) da cana-de-açúcar é processado pelas usinas brasileiras liberando o caldo. Este é concentrado, resultando no mel, a partir do qual se obtém o açúcar (por cristalização). O subproduto desse processo, o melaço, ou mel final, é então combinado com o caldo de segunda e encaminhado para dornas de fermentação, onde se obtém o etanol (Bioetanol, 2008).

2.2 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, não filamentosos, caracteristicamente esféricas ou ovais, são amplamente encontradas na natureza. As leveduras de brotamento, como *Saccharomyces*, reproduzem-se formando células desiguais de forma assexuada. No brotamento, a célula parental forma uma protuberância na sua superfície externa e à medida que o broto se desenvolve, o núcleo da célula parental se divide, e um dos núcleos migra para o broto. A membrana celular é sintetizada entre a célula parental e o broto. E assim, o broto se separa da célula parental. Uma célula de levedura pode produzir mais de 24 células filhas por brotamento (Lehninger, 2006).

As leveduras são capazes de crescimento anaeróbico facultativo. Podem utilizar oxigênio ou um componente orgânico como aceptor final de elétrons. Isto permite que os fungos sobrevivam em vários ambientes. Se o meio tiver oxigênio, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar hidratos de carbono formando dióxido de carbono e água; na ausência de oxigênio, as leveduras fermentam os carboidratos e produzem etanol e dióxido de carbono (Lehninger, 2006).

A levedura mais utilizada na produção do etanol é a *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura apresenta duas vias de utilização de sacarose bem definidas: a hidrólise extracelular pela ação da invertase periplasmática (produzindo glicose e frutose que são captadas e fermentadas pela célula), e outra envolvendo o transporte ativo da sacarose com posterior hidrólise intracelular do açúcar. Porém, a hidrólise extracelular do dissacarídeo é indesejada na produção de etanol combustível, pois contribui para incrementar o estresse osmótico sofrido pelas células, gerado pelos elevados níveis de açúcares redutores formados, e os monossacarídeos liberados no meio podem servir como fonte de carbono para microrganismos contaminantes do processo fermentativo (Dário et al., 2008).

Outra levedura com grande potencial biotecnológico é a *Kluyveromyces marxianus*, descrita pela primeira vez em 1888 por C. Hansen, que naquela época a denominou de *Saccharomyces marxianus*. Posteriormente, o pesquisador Marx foi a pessoa que originalmente isolou essa levedura a partir de uvas (Lodder e Kreger-van Rij, 1952). Entretanto, devido às diferenças na morfologia dos esporos e ascos, na capacidade de fermentação e oxidação de diferentes açúcares e na ocorrência de hibridização entre cepas, quando comparadas com a verdadeira levedura *Saccharomyces*, houve a necessidade de reclassificar a espécie *S. marxianus*,

em um novo táxon (táxon, sistema de classificação biológica) (van der Walt, 1970). Em 1956, van der Walt descreveu um novo gênero *Kluyveromyces*, a espécie do tipo *Kluyveromyces polysporus*.

Os estudos mais recentes da taxonomia da levedura *Kluyveromyces* empregam a análise da sequência multigênica para elucidar a filogenia das diferentes cepas, ao invés de realizar comparações de um único gene (Fonseca et al., 2008). Como resultado, a espécie *K. marxianus* foi proposta como do tipo conservada (Kurtzman, 2003; Lachance, 2007). A espécie do tipo originalmente descrita como *Kluyveromyces* por van der Walt em 1956, a chamada de *K. polysporus*, foi reclassificada para o novo gênero *Vanderwaltozyma* (Kurtzman, 2003; Lachance, 2007).

Na literatura a grande maioria dos estudos publicados sobre a levedura *K. marxianus* não visam elucidar sua bioquímica, metabolismo e fisiologia. A maior parte das obras publicadas são de potenciais explorados deste organismo, sem investigar o que ocorre em nível intracelular. Desta forma, só é possível ter uma visão macroscópica das reações celular, e conseqüentemente, da fisiologia do organismo (Fonseca et al., 2008).

Em termos de estudo bioquímico sobre enzimas de interesse industrial, a *K. marxianus* tem sido usada como fonte de inulinase, β -galactosidase, β -glicosidade e endopoligalacturonases. Além disso, com potencial menor de aplicação industrial, as proteínas fosfatases, carboxipeptidases e aminopeptidases têm sido relatadas (Fonseca et al., 2008).

O desenvolvimento de aplicações biotecnológicas com *K. marxianus* tem sido motivado por várias vantagens que tem, em relação a levedura *Kluyveromyces lactis*. Essas vantagens incluem o fato de poder crescer em uma ampla variedade de substratos e em altas temperaturas e maior taxa de crescimento específico (Rouwenhorst et al., 1998; Steensmam et al., 1988).

Um aspecto muito importante da ecologia da *K. marxianus* que deve ser levado em conta quando se considera a sua utilização biotecnológica é que os organismos foram isolados a partir de uma enorme variedade de *habitats*. Por conseguinte, a diversidade metabólica é muito ampla e, portanto, as aplicações biotecnológicas das cepas *K. marxianus* são múltiplas (Fonseca et al., 2008).

K. marxianus têm sido nos últimos anos descrita para produção de etanol, devido ao fato de suportar altas temperaturas. Entretanto, a sua tolerância ao etanol é menor quando comparada a levedura *S. cerevisiae*, esse efeito está correlacionado com a atividade da membrana plasmática ATPase (Rosa e Sa-correia, 1992).

Em 1984, Hacking et al. selecionaram cepas de leveduras para avaliar a capacidade de fermentação da glicose a etanol sob altas temperaturas. A tolerância de todas as espécies parecia diminuir com o aumento da temperatura, mas em geral, as cepas de *K. marxianus* foram mais tolerantes que as cepas de *S. cerevisiae*, que por sua vez pode produzir elevados rendimentos em etanol. Anderson et al. (1986) compararam *K. marxianus* isoladas a partir de uma usina de açúcar com a cepa CBS para a produção de etanol em altas temperaturas. As cepas CBS produziram a mesma quantidade de etanol que os novos isolados, mas com baixa viabilidade celular e alto tempo de cultivo.

Diferentes estratégias de processos têm sido utilizadas para a produção de etanol com *K. marxianus*, como bateladas com alta concentração do substrato (Grubb e Mawson, 1993), batelada alimentada (Ferrari et al., 1994; Love et al., 1996), processo contínuo (Love et al., 1998) e processo SSF (Moreno et al., 2013; Suryawati et al., 2008; García-aparício et al., 2011; Silva et al., 2015).

2.3 Metabolismo da glicose

Glicólise é o processo de hidrólise e oxidação da glicose que ocorre na ausência de oxigênio (processo anaeróbico), também chamado de via da hexose difosfato. A glicose é o principal substrato oxidável utilizada pela maioria dos organismos (fonte energética universal). A glicose ($C_6H_{12}O_6$) é convertida em duas moléculas de piruvato na via glicolítica (Lehninger, 2006).

A glicólise consiste em 10 reações enzimáticas que ocorrem no citosol das células, e utiliza 10% do potencial energético da glicose. A primeira fase da glicólise é chamada de *fase preparatória*, a qual consiste nas cinco primeiras etapas, em que a energia do ATP (adenosina trifosfato) é investida para aumentar o conteúdo da energia livre dos intermediários para a formação do produto final, o gliceraldeído 3-fosfato e o seu isômero diidroxiacetona fosfato (Lehninger, 2006).

Na segunda fase da glicólise, tem-se um ganho líquido de duas moléculas de ATP por molécula de glicose. E a energia também é conservada na formação de duas moléculas de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) para cada molécula de glicose. Em condições aeróbicas, o piruvato é oxidado com perda de carboxilato na forma de CO_2 , para liberar o Acetil-CoA que no ciclo do ácido cítrico será totalmente oxidado a CO_2 (Lehninger, 2006).

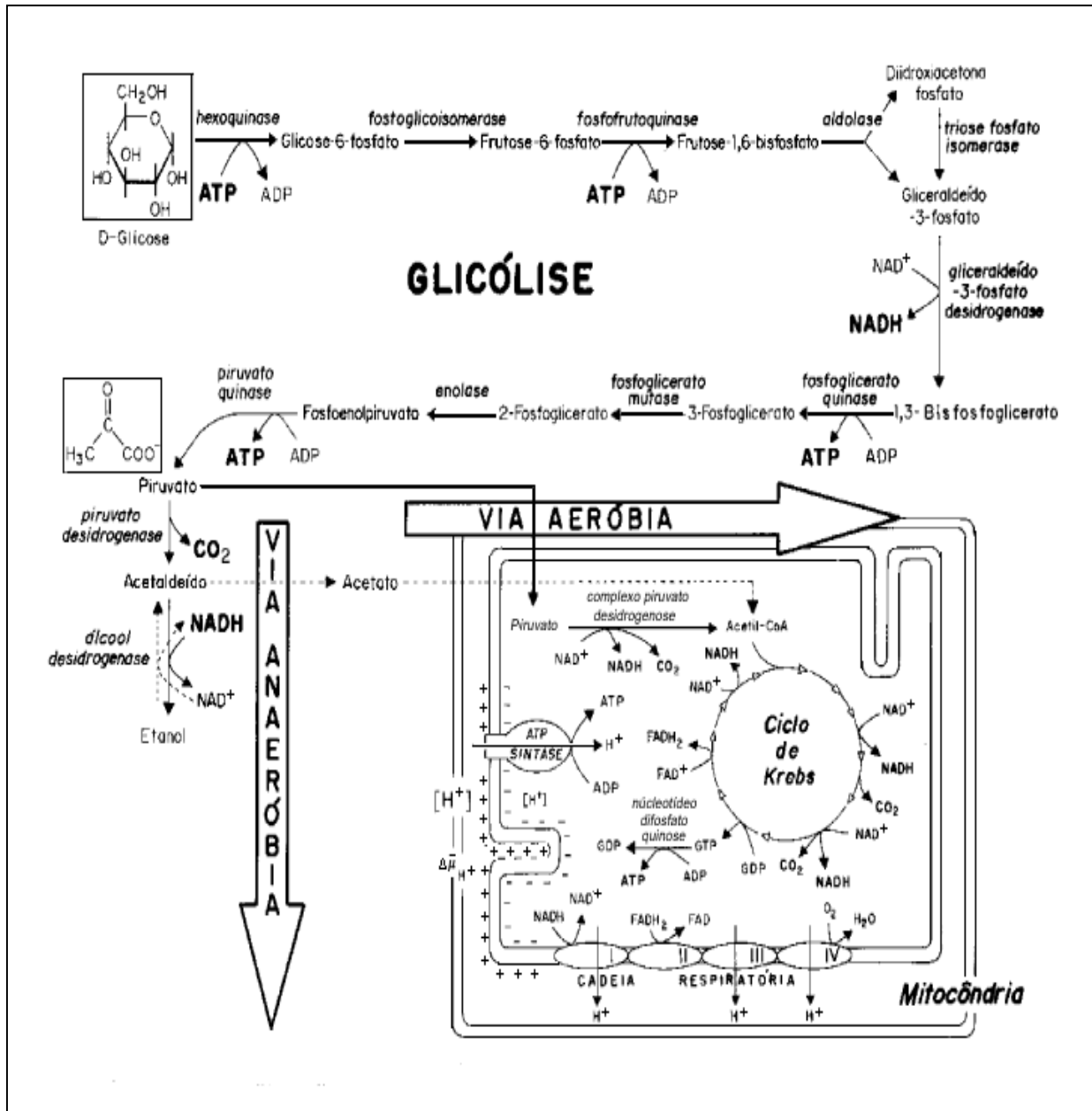
Outra rota para o metabolismo do piruvato é a sua redução a lactato por meio da chamada via da fermentação do ácido láctico. E a terceira grande rota do metabolismo do piruvato leva a produção de etanol, em condições anaeróbicas nas leveduras, denominada de fermentação alcoólica. A glicólise libera apenas uma pequena fração da energia total disponível na molécula da glicose, as duas moléculas de piruvato formadas pela glicólise ainda retém a maior parte da energia potencial química existente na molécula da glicose (Lehninger, 2006).

A glicose é catabolizada pela *S. cerevisiae* pela *via aeróbica* ou *anaeróbica*, para produzir ATP. Na ausência de O₂, a única possibilidade é a via anaeróbica, mas mesmo na presença de oxigênio, a via anaeróbica também é escolhida se a concentração de glicose estiver acima de um valor chamado *concentração crítica* (C_{crit}) (Barnett, 1976; Entian e Barnett, 1992; Alexander e Jeffries, 1990). A *S. cerevisiae* faz uso exclusivo da via aeróbica somente em concentrações abaixo da concentração crítica (C_{crit}) (Rettori e Volpe, 2000).

A explicação deste comportamento está no fenômeno chamado de *repressão por glicose*. Na presença de concentrações acima da C_{crit}, a glicose reprime a expressão dos genes que codificam enzimas do *ciclo de Krebs*, enzimas da *cadeia respiratória* e *estruturas mitocondriais* (Barnett, 1976; Porro et al., 1994). Portanto, atividade mitocondrial reduzida leva o piruvato para *via anaeróbica*, ou seja, para a produção de etanol. Por outro lado, em concentrações de glicose abaixo da C_{crit} e na presença de O₂, o piruvato seguirá a via aeróbica, por não se encontrarem reprimidos os genes em questão a *S. cerevisiae* possuirá alta atividade mitocondrial (Rettori e Volpe, 2000). A Figura 2, ilustra um diagrama do catabolismo da glicose em *S. cerevisiae*.

A fermentação alcoólica é um processo de baixo rendimento energético no qual o etanol permanece com a maior parte da energia contida na molécula de glicose, energia esta que será utilizada quando o etanol queimar como combustível (Rettori e Volpe, 2000).

Figura 2. Diagrama do catabolismo da glicose em células de *S. cerevisiae*.



Fonte: Rettori e Volpe, 2000.

Para a produção de etanol, a maioria das usinas empregam o processo em “batelada alimentada” com recirculação e tratamento das leveduras (clássico processo Melle-Boinot). Esse processo é considerado o mais seguro quando se tem problemas de assepsia e manutenção, pois ao final de cada batelada, a dorna é esvaziada e realiza-se a assepsia antes de iniciar uma nova fermentação (Martins, 2009).

2.4 Produção de etanol

O etanol ou bioetanol começou a ser utilizado no Brasil em larga escala há mais de quarenta anos. Com a preocupação mundial devido ao aquecimento global e o aumento no preço do petróleo têm-se expectativas de um grande crescimento na produção de bioetanol. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, que é a matéria-prima mais eficiente para a produção de etanol (Macrelli et al., 2014).

A ascensão do etanol teve início na década de 70, quando foi lançado o Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Nessa época, o mundo enfrentava a crise do petróleo. O governo brasileiro apostou no Proálcool como alternativa para reduzir a dependência das importações do combustível fóssil. O alto preço do petróleo fez o programa de incentivo à produção e ao uso de etanol aumentar expressivamente (Severo, 2009).

O Proálcool teve grande sucesso até meados da década de 90, época em que cerca de 96% dos veículos nacionais eram fabricados com motores movidos a etanol. Depois de um momento de grande incentivo, o Proálcool entrou em crise, devido ao esgotamento dos recursos governamentais destinados ao programa e ao descompasso entre a oferta e a demanda de etanol. Além disso, a partir de 1986, o preço do petróleo caiu drasticamente, reduzindo a competitividade do etanol no mercado dos combustíveis (Severo, 2009).

Depois de um período de sucesso e de crise, atualmente o setor sucroalcooleiro está enfrentando uma terceira fase, a de recuperação. Nesta nova etapa, o Brasil voltou a ser um grande consumidor de etanol, devido à adoção da tecnologia *flex-fuel* nos motores dos automóveis. Além disso, recentemente o Brasil tornou-se também grande exportador mundial de bioetanol (Severo, 2009).

O bioetanol produzido no Brasil é considerado um dos principais substitutos da gasolina, sendo empregado como combustível na forma hidratada de 92,6 a 93,8% INPM, no caso de motores movidos a etanol, ou na forma anidra mínimo de 99,3% INPM, como aditivo à gasolina (Martins, 2009). A Tabela 1 apresenta a evolução da proporção da mistura de etanol anidro na gasolina.

Tabela 1. Proporção da mistura de etanol anidro à gasolina.

Ano	Volume de etanol (L)	Volume de gasolina (L)	Porcentagem de etanol na gasolina (%)
1979	0,14	0,86	14
1980	0,17	0,83	17
1981	0,12	0,88	12
1982-1986	0,20	0,80	20
1987-2002	0,22	0,78	22
2002-2007	0,24	0,76	24
2007-2009	0,25	0,75	25
2010-2012	0,20	0,80	20
2013-2014	0,25	0,75	25
2015*	0,27	0,73	27

Fonte: Adaptado de ANP (2009) e Nova Cana (2015). *Mistura a partir de março de 2015.

A necessidade de produzir combustíveis renováveis com menor custo, a fim de substituir os combustíveis fósseis, está sendo refletida na agenda política de muitos países que visam o desenvolvimento de uma fonte de energia confiável para garantir um combustível seguro, promovendo o desenvolvimento rural e combatendo as alterações climáticas através da redução da emissão de gases do efeito estufa (Macrelli et al., 2014).

Entre os combustíveis alternativos, o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar pode fornecer uma contribuição substancial em termos de quantidade produzida e impacto ambiental, especialmente, se a fração lignocelulósica da cana-de-açúcar for usada para a produção de etanol (Silalertruksa et al., 2011; Galdos et al., 2013; Leal et al., 2013).

O etanol produzido a partir da sacarose da cana-de-açúcar pode também ser denominado de etanol de primeira geração (1G). O etanol de segunda geração (2G) ou celulósico é aquele produzido a partir do resíduo gerado após a moagem da cana-de-açúcar, ou seja, das fibras lignocelulósicas.

Grandes quantidades de etanol 2G podem ser produzidas a partir do bagaço de cana-de-açúcar e da palha, que são resíduos gerados da produção de etanol de 1G. A tecnologia 2G ainda não é madura como a 1G na produção de etanol, portanto, é menos economicamente viável a sua produção (Macrelli et al., 2014). Recentemente, algumas empresas têm demonstrado interesse na

produção de etanol a partir dos resíduos da biomassa através da construção de plantas em escala comercial (Bacovsky et al., 2012; Balan et al., 2013).

A disponibilidade da cana-de-açúcar para a produção de etanol é afetada pela volatilidade do mercado mundial, devido em parte à demanda por essa matéria-prima para produzir açúcar para a indústria alimentícia (Tyner et al., 2010). O bagaço e palha da cana-de-açúcar podem ser também queimados para a geração de bioeletricidade, principalmente, nas áreas onde não existem outros meios de geração de energia ou existem apenas fontes sazonais. No Brasil, as hidrelétricas são as principais fontes de eletricidade, sendo assim, os resíduos da cana-de-açúcar podem ser um complemento adequado durante a estação seca (Dias et al., 2011). Além disso, as biorrefinarias que produzem alternativas e/ou produtos mais rentáveis que o etanol a partir de açúcares, podem reduzir a longo prazo a rentabilidade das usinas de etanol, devido à concorrência da matéria-prima (Chandel et al., 2012; Macrelli et al., 2014).

Os preços de mercado e a competição por matéria-prima são as forças que impulsionam o interesse em tecnologias que podem reduzir os custos da produção de etanol. O custo da produção do bioetanol pode ser reduzido resolvendo problemas técnicos, maximizando rendimento e produtividade e otimizando o projeto da produção em larga escala (Chandel et al., 2012; Macrelli et al., 2012). O rendimento do etanol a partir da cana-de-açúcar pode ser melhorado se o bagaço, já presente como resíduo no processo 1G for tratado para se produzir o etanol 2G, em vez de ser queimado para gerar eletricidade, embora a rentabilidade seja fortemente dependente do preço de mercado do etanol (Dias et al., 2011).

A moagem da cana-de-açúcar seguida pela fermentação dos açúcares liberados são as principais etapas do processo de produção de etanol 1G. No entanto, a produção de etanol 2G é mais complexa, o material lignocelulósico deve ser submetido a um pré-tratamento para degradar a matriz estrutural, deve-se hidrolisar os açúcares polimerizados e, em seguida, fermentar esses monômeros a etanol. Os principais desafios desse processo são maximizar a conversão lignocelulósica e minimizar a perda de açúcares, o que se torna difícil utilizando condições operacionais suaves (Macrelli et al., 2014).

A palha da cana é um dos resíduos gerados durante a sua colheita, juntamente com as ponteiros e as folhas verdes, material que é deixado no campo como fertilizante e para o controle de pragas. Porém, incluir a palha no processo poderia aumentar ainda mais a produção de etanol.

Recentemente, trabalhos mostraram que cerca de 65% do resíduo a partir da colheita pode ser removido, como a palha dos campos agrícolas, sem causar efeitos negativos (Franco et al., 2011).

Por outro lado, estudos sobre destilaria de etanol mostraram que é possível economizar energia e eletricidade extra gerada pela inclusão de uma unidade de secagem para remover com eficiência a umidade dos combustíveis (bagaço e palha) antes da combustão, aumentando a pressão da caldeira para aumentar a entalpia de vapor da água dentro das turbinas, integrando e otimizando a rede de trocadores de calor para minimizar a necessidade de vapor durante o processo (Ensinas et al., 2007a, 2007b; Macrelli et al., 2012).

As vantagens são grandes quando os processos de 1G e 2G são integrados como energia e fluxo de material. Em uma destilaria autônoma, o processo tradicional de produção de etanol é dividido em várias etapas, primeiramente o açúcar é extraído por moagem da cana. O sumo é então clarificado, concentrado por evaporação e fermentado a etanol, seguido por destilação. Após a extração do açúcar, o bagaço gerado na moagem pode ser usado na produção do etanol 2G em uma planta 2G anexa à destilaria autônoma (Sassner e Zacchi, 2008; Macrelli et al., 2012).

Algumas considerações devem ser feitas na implementação de uma planta de etanol 2G. O preço da matéria-prima e das enzimas, assim como o preço de mercado do etanol e da eletricidade também determinam a viabilidade do projeto de uma planta de etanol 2G. O custo das enzimas tem sido o maior impacto sobre o custo de produção do etanol 2G, seguido pelo custo de venda da eletricidade e em menor grau, o custo de transporte da palha. Embora tenha sido mostrado que se dobrar a carga de enzima, diminui-se o custo de produção do etanol 2G, o custo total da utilização das enzimas é a combinação do custo da enzima, a eficiência hidrolítica e a eficácia do pré-tratamento (Macrelli et al., 2012, 2014).

O grande desafio da produção economicamente viável do etanol a partir da biomassa lignocelulósica está em selecionar a melhor opção dentre as diferentes tecnologias de disponibilização de carboidratos presentes no bagaço de cana-de-açúcar a partir da hidrólise da celulose em termos de custo, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado (Silva, 2011).

2.5 Materiais Lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica oferece uma fonte abundante e barata de recurso natural que pode ser empregado como energia renovável. O resíduo da cana-de-açúcar, chamado de bagaço, é gerado durante a moagem e é abundante em regiões tropicais e subtropicais como, Brasil, Índia e sul dos Estados Unidos. Os materiais lignocelulósicos são constituídos, principalmente, por celulose, hemicelulose, lignina e outros componentes em menores proporções (Santos et al., 2012). A composição média dos principais constituintes do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) *in natura* é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição média do BCA *in natura*.

Componentes	Composição (%)
Celulose	32-48
Hemicelulose	19-24
Lignina	23-32

Fonte: Santos et al., 2012.

O BCA gerado durante a produção do etanol de primeira geração é uma matéria-prima promissora que pode também ser transformada em etanol celulósico ou etanol 2G, devido ao alto teor de carboidratos remanescentes nas fibras (Macrelli et al., 2012). No entanto, o baixo rendimento obtido a partir da conversão dos polissacídeos em açúcares fermentescíveis é ainda um desafio devido a recalcitrância da biomassa lignocelulósica que limita o acesso das celulasas às cadeias da celulose (Davison et al., 2005; Vargas e Pereira, 2010).

Estudos sobre a recalcitrância do material lignocelulósico na hidrólise enzimática indicam que a porosidade limitada da parede celular lignificada e fibras hidrofílicas são fatores-chave que regem na eficiência da hidrólise enzimática dos polissacarídeos da biomassa. A remoção parcial ou total da hemicelulose e a redução ou deformação da lignina são fatores que aumentam a acessibilidade das celulasas a celulose (Langan et al., 2014).

Uma estratégia para fornecer alta digestibilidade enzimática da celulose é através da manipulação genética ou o desenvolvimento de novas biomassas com menor teor de lignina, melhorando a conversão do material lignocelulósico. Recentemente, o setor sucroalcooleiro tem

feito esforços para selecionar plantas de cana-de-açúcar com menor teor de lignina e/ou composição alterada da lignina como uma maneira de diminuir a recalcitrância lignocelulósica. Como resultado, híbridos com diferentes composições foram selecionados e avaliados quanto à composição química e digestibilidade enzimática para fazer avançar o desempenho do BCA no processo de etanol 2G (Masarin et al., 2011).

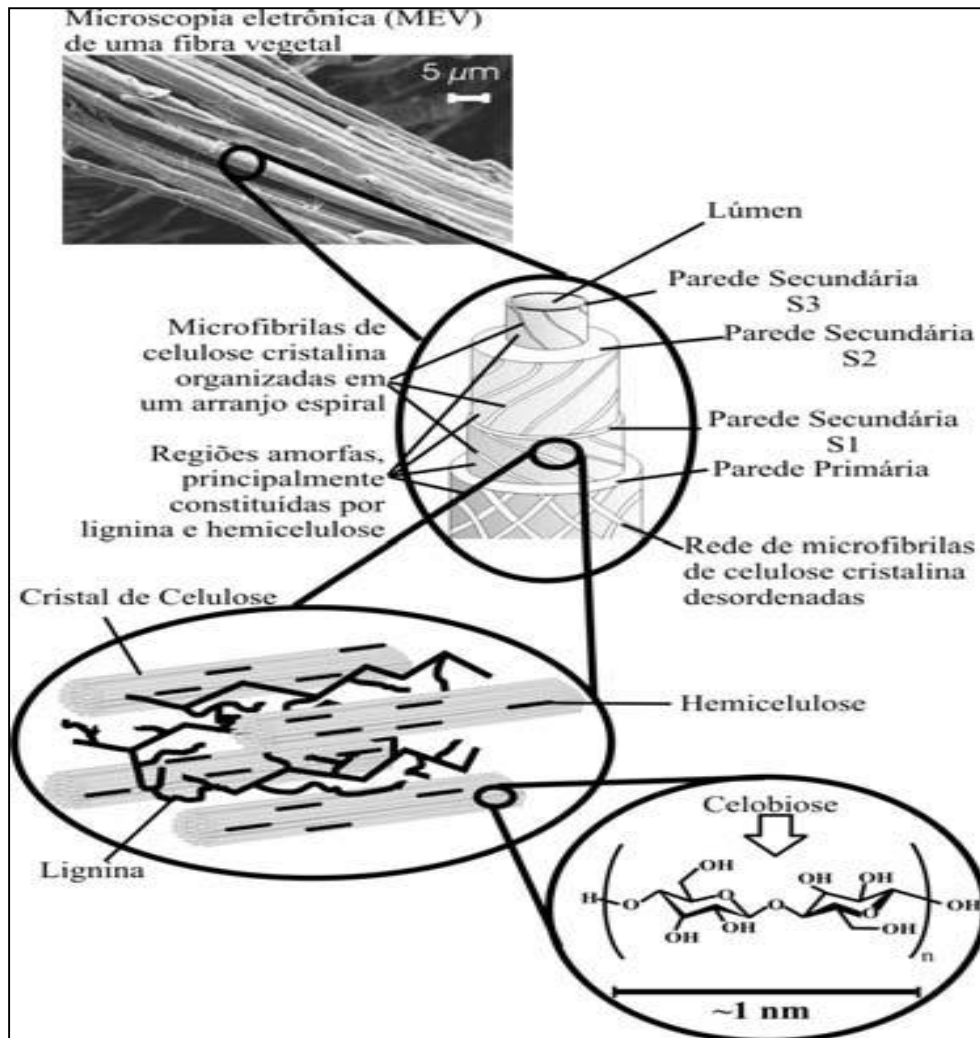
2.5.1 Fibras e fibrilas

As fibras naturais de origem vegetal são constituídas basicamente de celulose, hemicelulose, pectina e lignina. A porcentagem individual destes componentes varia de acordo com os diferentes tipos de fibras. Esta variação também pode ser afetada por condições de crescimento e colheita (Girio et al., 2010).

As fibras vegetais podem ser consideradas como compósitos de fibrilas de celulose mantidas coesas por uma matriz constituída de lignina e hemicelulose (Jayaraman et al., 2003), cuja função é agir como uma barreira natural à degradação microbiana e servir como proteção mecânica. As características estruturais das fibras lignocelulósicas estão relacionadas à natureza da celulose e à sua cristalinidade (Figura 3) (Silva et al., 2009).

A fibra lignocelulósica tem uma estrutura de camadas complexas e apresenta uma parede primária fina durante o crescimento das células, que circunda uma parede secundária (Figura 3). A parede secundária é constituída de três camadas (S_1 , S_2 e S_3), onde a camada intermediária S_2 determina as propriedades mecânicas da fibra e consiste em uma série de microfibrilas, helicoidalmente formadas por longas cadeias de celulose e organizadas no sentido da fibra. Tais microfibrilas têm o diâmetro de 10 a 30 nm e são resultantes do empacotamento de 30 a 100 cadeias de celulose estendidas (Pietak et al., 2007; Ren et al., 2008).

Figura 3. Estrutura de uma fibra vegetal.

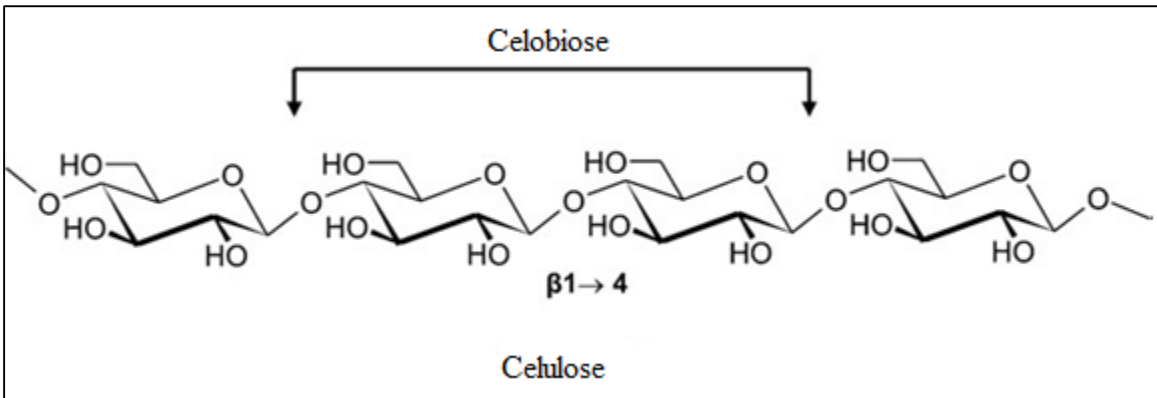


Fonte: Silva et al., 2009. A imagem de MEV refere-se a uma fibra de eucalipto.

2.5.2 Celulose

A celulose é o principal componente dos materiais lignocelulósicos. É um polímero natural de cadeia longa $(C_6H_{10}O_5)_n$, um homopolissacarídeo linear constituído por unidades de celobiose ou anidroglicose sindiotática ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β -(1→4), como mostra a Figura 4.

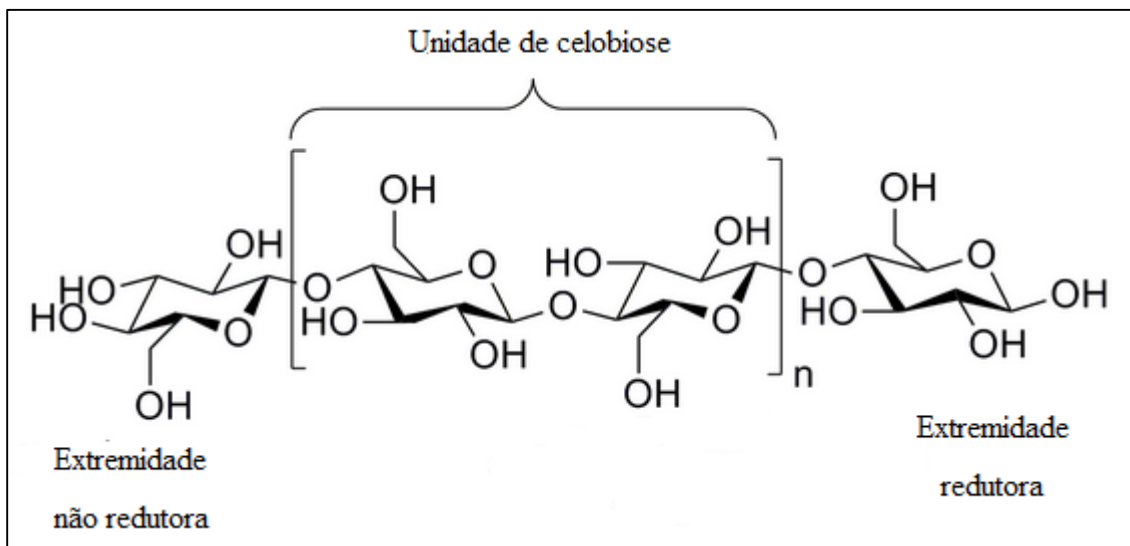
Figura 4. Unidade de celobiose.



Fonte: Fengel e Wegener, 1989.

O comprimento da cadeia da celulose nativa varia entre 10.000 a 15.000 resíduos conforme a sua origem, grau de maturação da parede celular, tempo de envelhecimento e processamento ao qual as fibras foram submetidas (Fengel e Wegener, 1989). A hidrólise da celulose gera polímeros menores, oligossacarídeos com cadeias terminais redutoras e não redutoras (Figura 5) que após hidrólise mais extensa, decompõem-se dando origem à celobiose (dissacarídeo redutor) e à glicose.

Figura 5. Cadeias com extremidades não redutora e redutora do polímero de celulose.

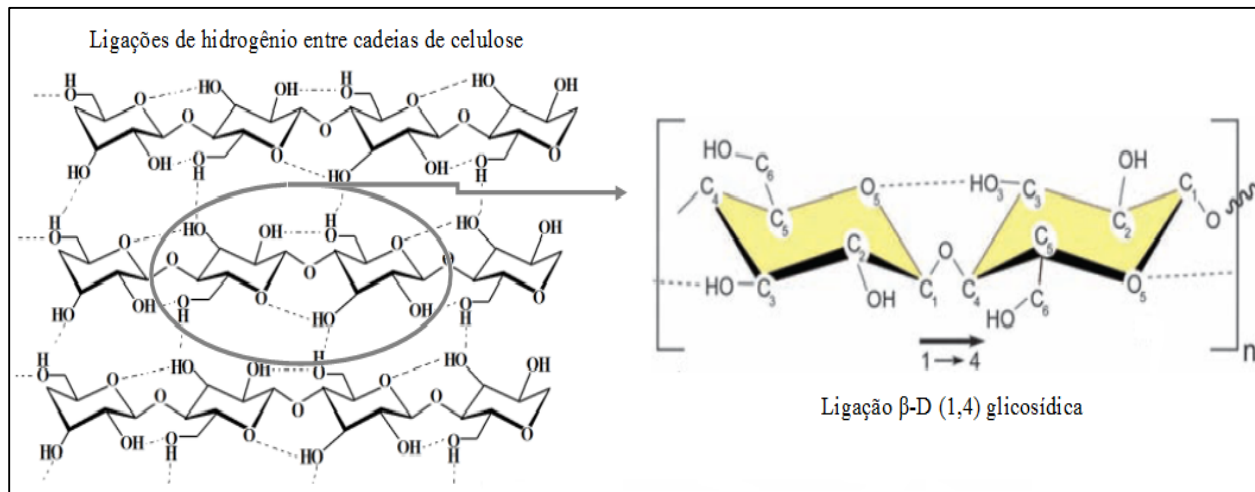


Fonte: Olsson e Westman, 2013.

Com a hidrólise da ligação β -D (1,4) glicosídica forma-se uma cadeia redutora e outra não redutora. A cadeia redutora tem um aldeído hidratado, derivado da formação do anel piranose por ligação intramolecular hemiacetal. O grupo não redutor é formado por C₄-OH terminal.

O polímero natural celulose possui uma disposição linear devido à hidroxila no carbono anomérico apresentar orientação equatorial (Figura 6), a conformação do anel piranosídico assume disposição em cadeira ⁴C₁ e cadeias adjacentes formam uma rede de ligações de hidrogênio intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes) e intramoleculares (entre unidades de glicose da mesma molécula) que estabilizam o agregado (Fengel e Wegener, 1989).

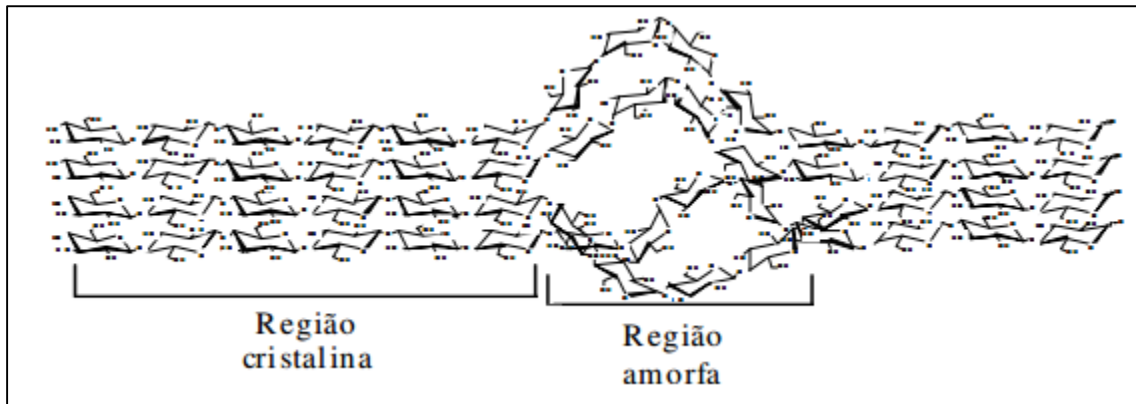
Figura 6. Posição das ligações inter e intramoleculares na celulose.



Fonte: Poletto et al., 2013.

A estrutura da celulose nativa apresenta duas regiões: cristalina e amorfa. Regiões altamente ordenadas são denominadas de cristalinas e as regiões em que a cadeia apresenta orientação randomizada são denominadas de amorfas, Figura 7. Feixes de moléculas de celulose se agregam na forma de microfibrilas nas regiões cristalinas que alternam-se com as regiões menos ordenadas (amorfas). As microfibrilas constroem fibrilas e estas constroem as fibras celulósicas, como consequência dessa estrutura fibrosa, a celulose possui alta resistência e é praticamente insolúvel em água e em solventes orgânicos comuns (Fan et al., 1987).

Figura 7. Regiões específicas da celulose.



Fonte: Adaptado de Sun e Cheng, 2002.

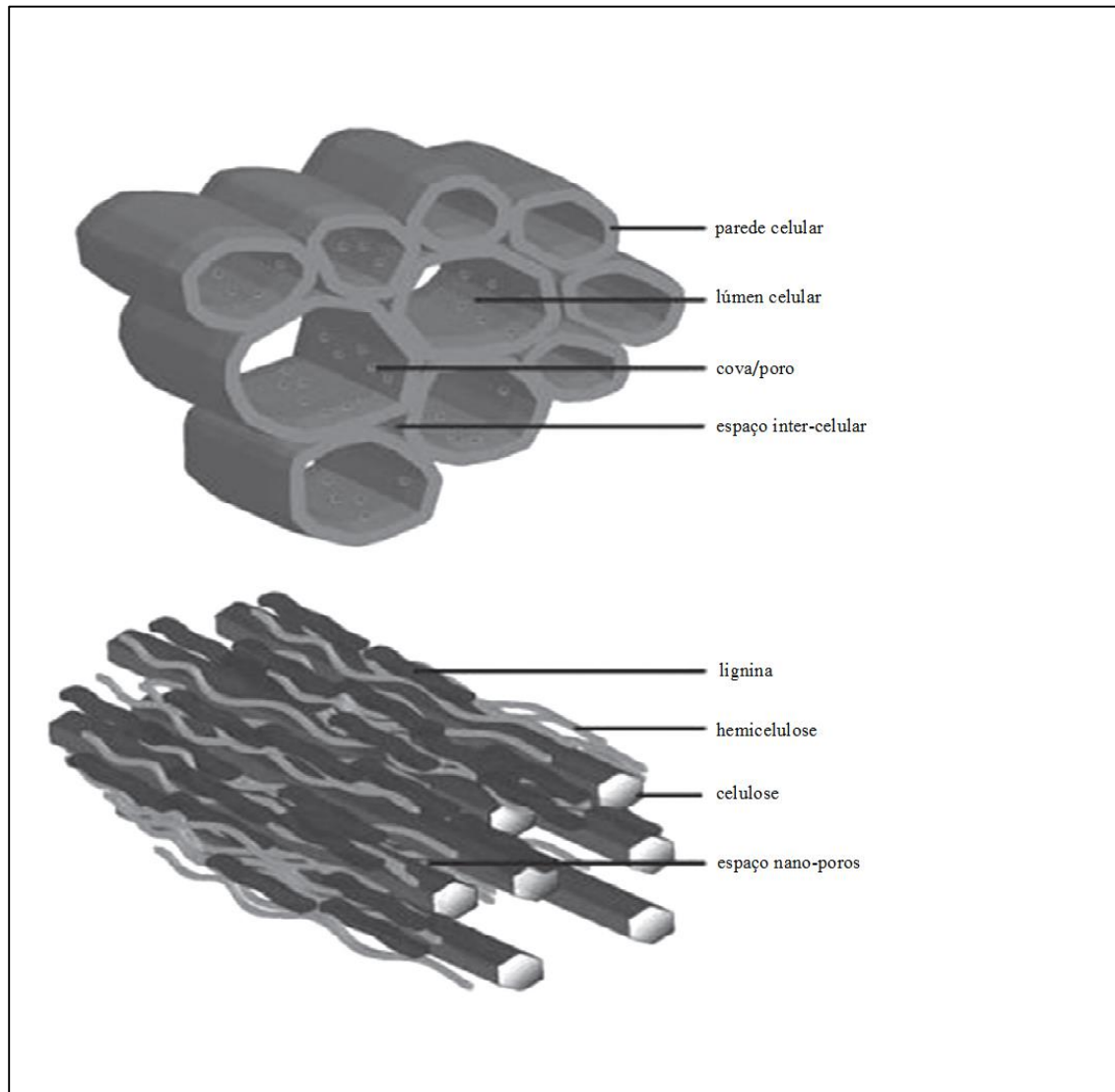
O contato íntimo entre a celulose e a celulase é o passo de pré-requisito para a hidrólise enzimática ocorrer, assim a área superficial da celulose é um fator crítico do rendimento e da velocidade da hidrólise enzimática (Wang et al., 2012; Meng e Ragauskas, 2014). A área superficial do substrato pode ser dividida em área de superfície interna, que é essencialmente refletida pela porosidade da biomassa, e área superficial externa, que é principalmente determinada pelo tamanho da partícula (Arantes e Saddler, 2011; Zhao et al., 2012). Estudos mostram que a acessibilidade da celulase à celulose é principalmente através dos poros da parede celular vegetal, em vez da área superficial externa do substrato e, mais especificamente, aproximadamente mais de 90% do substrato da digestibilidade enzimática é contribuída pela acessibilidade da superfície dos poros (Huang et al., 2010; Luo e Zhu, 2010; Wang et al., 2012).

Existem várias escalas de porosidade na biomassa a partir do lúmen celular para nano-poros entre as microfibrilas revestidas como mostra a Figura 8. O lúmen celular representa a maior escala de porosidade, e não é uma barreira crítica para as enzimas, porque seu tamanho é normalmente na faixa de dezenas de micrômetros. Covas são regiões da parede celular onde a parede celular secundária está ausente, e um poro aberto é mantido entre o lúmen celular adjacente. Os poros têm apenas 20-100 nm e ainda não representam o obstáculo mais importante para as enzimas (Meng e Ragauskas, 2014).

Carpita et al. (1979) estimou a arquitetura dos poros da parede celular vegetal em aproximadamente 5-10 nm de diâmetro que é demasiadamente pequeno para permitir a difusão significativa de enzimas. O fenômeno de transporte sugere que o tamanho dos poros deve ser, pelo menos, na faixa de 50-100 nm para permitir a penetração suficiente das enzimas (Davison et al.,

2013). Muitos estudos têm indicado uma relação positiva entre a área superficial interna e a velocidade da hidrólise enzimática (Huang et al., 2010; Luo e Zhu, 2010).

Figura 8. Ilustração das várias escalas de porosidade a partir do lúmen celular.



Fonte: Viamajala et al., 2010.

O aumento da acessibilidade da celulose não depende apenas do quanto da biomassa total foi removida, mas também, qual é o componente e de onde foi removido (Leu e Zhu, 2013). A hemicelulose, que geralmente é encontrada na superfície exterior das fibras de celulose, pode também ser difundida para o espaço interfibrilar através dos poros das fibras, por isso, tem sido proposto que a hemicelulose atua como uma barreira que limita a acessibilidade da celulose (Meng

e Ragauskas, 2014). Portanto, a adição de enzimas suplementares, como a xilanase, durante a hidrólise enzimática pode aumentar a acessibilidade à celulose tendo como resultado solubilização da xilana.

Em estudo recente, Hu et al. (2011) reportaram melhora significativa na acessibilidade da celulose indicada pelo método *Simons' stain*, devido ao aumento da fibra por inchaço e porosidade causada pela interação sinérgica da xilanase e celulase. Além disso, a remoção da xilana, o efeito dos componentes da cadeia lateral, tais como grupo acetil na acessibilidade da celulose tem sido investigado recentemente, indicando que o grupo acetil pode restringir o acesso a celulose por inibição da ligação produtiva aumentando o diâmetro da cadeia da celulose ou mudando a sua hidrofobicidade (Pan et al., 2006; Kumar e Wyman, 2009).

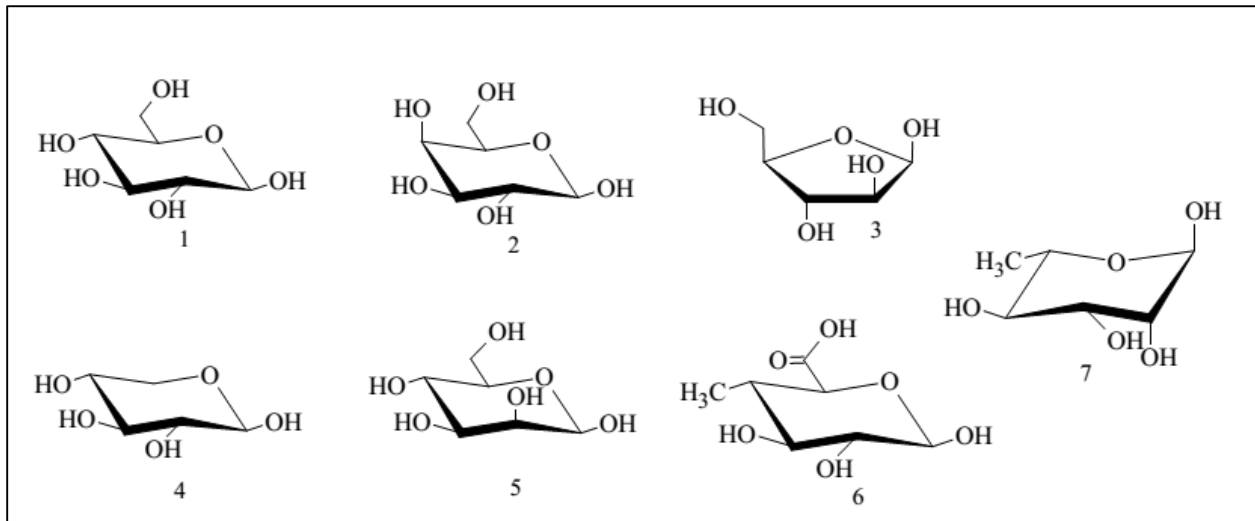
Embora a remoção da lignina tem resultado em uma melhora no rendimento da hidrólise enzimática na maioria dos trabalhos atuais o efeito direto da remoção da lignina na acessibilidade da celulose não é totalmente claro. A lignina reduz a eficácia da hidrólise enzimática limitando a acessibilidade à celulose, assim como, a ligação não produtiva com a celulase reduz também a eficiência da hidrólise enzimática, portanto, esses dois papéis da lignina ainda não são totalmente compreendidos (Meng e Ragauskas, 2014).

Selig et al. em 2009, reportaram que a presença da lignina pode não obstruir diretamente a celulose presente na biomassa, mas sim afetar indiretamente na ação da celulase por sua associação com a hemicelulose. Kumar e Wyman (2009) relataram que a deslignificação do sabugo de milho aumentou a eficácia da enzima, mas obteve um efeito muito limitado na acessibilidade da celulose, indicando que a lignina não estava atuando diretamente no controle da acessibilidade da celulose, porém a lignina restringia a acessibilidade da hemicelulose, que por sua vez controla o acesso da celulase a celulose (Kumar e Wyman, 2009).

2.5.3 Hemiceluloses

As hemiceluloses são polissacarídeos que estão intimamente associadas à celulose na parede celular vegetal. São constituídas de vários monossacarídeos polimerizados, como pentoses (L-arabinose e D-xilose), hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-O-metil-glucurônico e ácido galacturônico) (Sjöström, 1999). As estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses são apresentadas na Figura 9.

Figura 9. Estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.



Fonte: Sjöström, 1999. 1. D-glicose, 2. D-galactose, 3. L-arabinose, 4. D-xilose, 5. D-manose, 6. 4-O-metil-D-glucurônico, 7. L-ramnose.

A hemicelulose tem peso molecular menor que a celulose e possui ramificações laterais curtas que consistem de diferentes açúcares, que são polímeros facilmente hidrolisáveis (Fengel e Wegener, 1989). A hemicelulose atua como uma conexão entre a lignina e a fibra de celulose e fornece uma maior rigidez a rede celulose-hemicelulose-lignina (Laureano et al., 2005).

As hemiceluloses por não possuírem regiões cristalinas são atingidas mais facilmente por produtos químicos, todavia, se ocorrer a perda de alguns substituintes da cadeia, as hemiceluloses podem sofrer cristalização induzida pela formação de ligações de hidrogênio a partir de hidroxilas de cadeias adjacentes (Pu et al., 2013).

O principal açúcar encontrado nas hemiceluloses do BCA é a xilose, que se une por ligações glicosídicas nas posições 1 e 4 (Silva et al., 2009). A hemicelulose é bastante hidrofílica, contém considerável grau de ramificação entre suas cadeias, com natureza altamente amorfa e grau de polimerização (GP) variando entre 100 a 200. O teor de hemicelulose pode variar de 19 a 35% dependendo do tipo de tecido vegetal e espécie a que pertence (Yang et al., 2008).

A solubilidade dos diferentes componentes da hemicelulose estão na ordem decrescente: manose, xilose, glicose, arabinose e galactose. A solubilidade aumenta com o aumento da temperatura. A solubilização dos componentes da hemicelulose na água começa em cerca de 180 °C sob condições neutras de acordo com Bobleter (1994). Garrote et al. (1999), entretanto,

menciona que já a partir de 150 °C a hemicelulose solubiliza. A solubilização dos compostos lignocelulósicos não depende apenas da temperatura, mas também de outros fatores como o teor de umidade e o pH (Fengel e Wegener, 1989).

A reação de auto-hidrólise envolve a formação de ácidos a partir dos componentes da hemicelulose, tais como o ácido acético, ácido fórmico e o ácido glucurônico (Timell, 1967; McGinnis et al., 1983). Estes ácidos gerados catalisam a hidrólise da hemicelulose (Lora e Wayman, 1978), no entanto os ácidos formados na auto-hidrólise são ácidos fracos, por isso, estes não conseguem hidrolisar a celulose.

A hemicelulose tem sido considerada um componente contribuinte para a recalcitrância da biomassa recobrindo e protegendo as fibras da celulose, dificultando a digestibilidade enzimática. Além disso, xilanas tem alta afinidade pela celulose e podem ser adsorvidas irreversivelmente sobre a superfície da celulose. Vários estudos têm indicado que a remoção de uma elevada porcentagem da hemicelulose pode aumentar a digestibilidade enzimática da celulose (Sun e Cheng, 2005; Adel et al., 2010). O pré-tratamento hidrotérmico e ácido diluído hidrolisam a hemicelulose, aumentando a acessibilidade da celulose para as celulases e, conseqüentemente, aumentam a conversão enzimática da celulose.

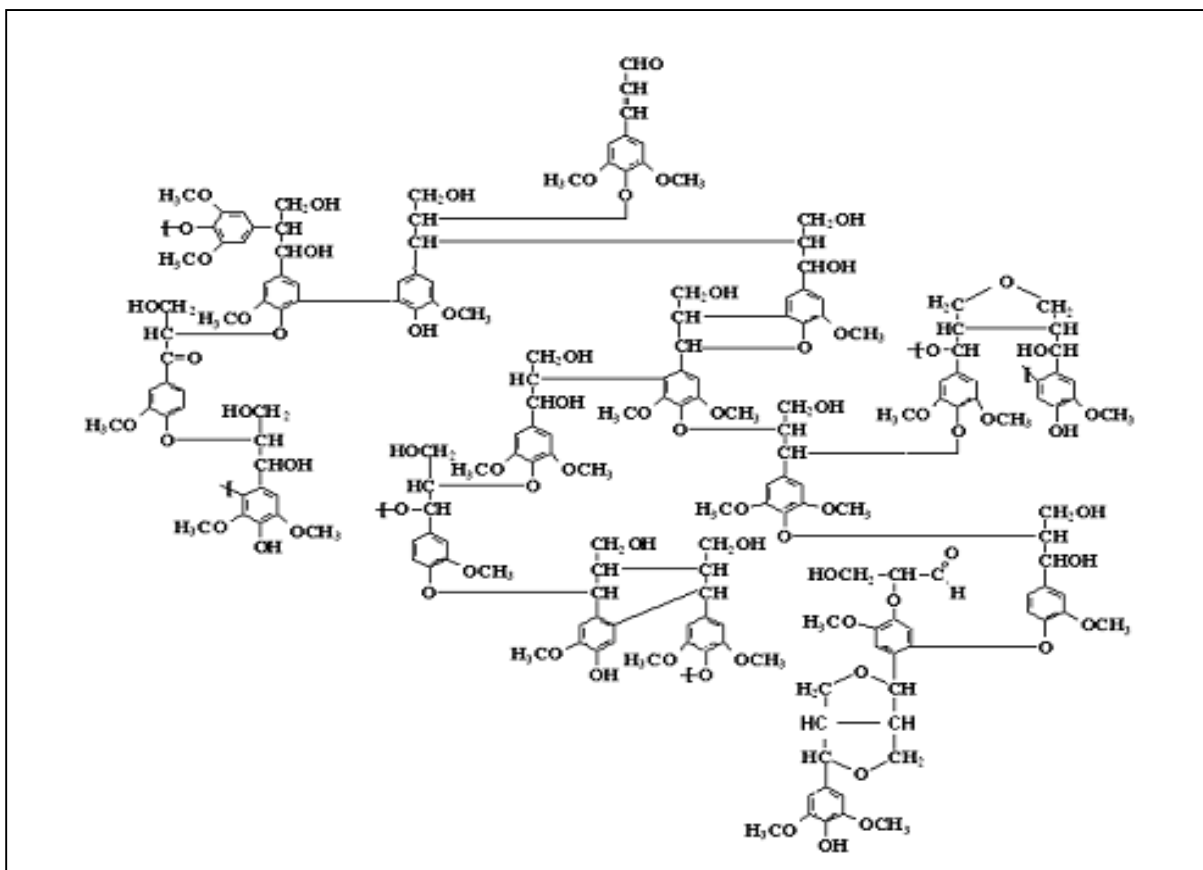
Estudos recentes mostraram que xilo-oligômeros inibem a ação da celulase e tem forte efeito de inibição na velocidade inicial da hidrólise enzimática da celulose mais que na xilana ou xilose em concentrações semelhantes e que celulases se ligam mais fortemente nas xilanas que nas celuloses (Qing e Wyman 2011; Pu et al., 2013). Como resultado, xilana e xilo-oligômeros parecem reduzir a reatividade da celulase para a celulose por associação indesejável com a mesma. Portanto, a remoção da hemicelulose durante o pré-tratamento hidrotérmico e/ou ácido diluído não apenas aumenta a acessibilidade das celulases, mas também reduz inibição das celulases por xilo-oligômeros durante a hidrólise enzimática, o que contribui para a redução na recalcitrância da biomassa pré-tratada (Pu et al., 2013).

2.5.4 Lignina

A lignina é uma das macromoléculas mais abundantes na natureza depois da celulose, sendo incorporada durante o crescimento celular do vegetal. A lignina é um material hidrofóbico com estrutura tridimensional e amorfa, altamente ramificada, podendo ser classificada como um

polifenol, o qual é constituído por um arranjo irregular de várias unidades de fenilpropano que pode conter grupos hidroxila e metoxila como substituintes no grupo fenil (Silva et al., 2009). A Figura 10 ilustra genericamente a molécula de lignina.

Figura 10. Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de *Fagus sp.*



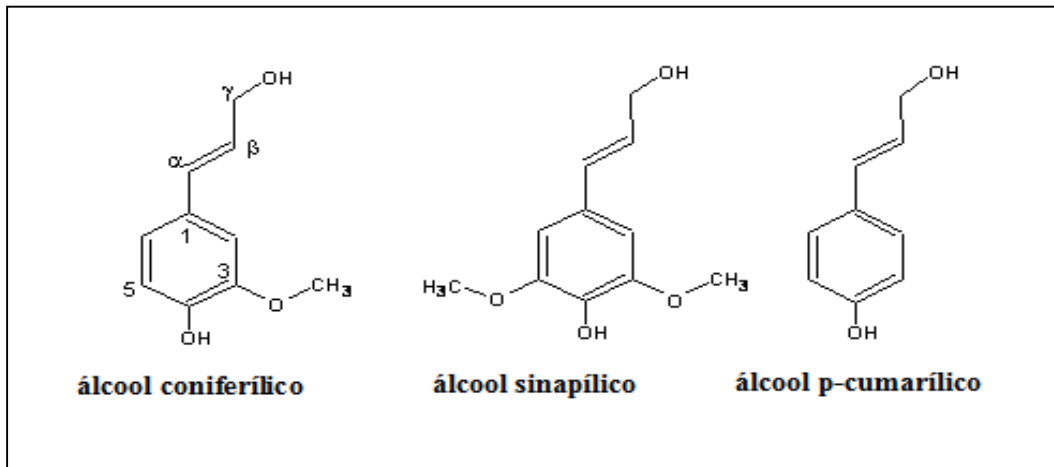
Fonte: Fengel e Wegener, 1989.

Enquanto alguns livros textos (por exemplo, Fengel e Wegener, 1989) apresentam o teor de lignina presente nos materiais lignocelulósicos como sendo da ordem de 20 a 30%, outros autores relatam valores entre 10 a 25% (Knauf et al., 2004). A lignina atua como material adesivo, como agente de enrijecimento no interior das fibras e como barreira contra degradação enzimática e microbiana da parede celular.

O teor de aromáticos na lignina é elevado, isto é resultante da polimerização enzimática catalisada pelos seus precursores (Ruffell et al., 2008). O mecanismo de biossíntese da lignina se

processa a partir de três álcoois monoméricos, o álcool coniferílico, o álcool sinapílico e o álcool *p*-cumarílico (Figura 11).

Figura 11. Estrutura química dos precursores da lignina.



Fonte: Sjöström, 1992.

A força de adesão entre as fibras de celulose e a lignina é ampliada pela existência de ligações covalentes entre as cadeias de lignina e os constituintes da celulose e da hemicelulose (Silva et al., 2009). Existe uma grande dificuldade na elucidação química da estrutura da lignina devido ao fato de não haver um método bem estabelecido para isolar a lignina em sua forma nativa (John et al., 2008).

A lignina por ser o segundo composto orgânico mais abundante na Terra depois da celulose, desempenha um papel fundamental em qualquer processo que utilize fibras celulósicas. Na indústria a lignina é queimada para gerar vapor nas caldeiras ou pode ser utilizada como fonte de produtos químicos para a produção de detergentes (Ruffell et al., 2008).

A lignina é considerada o componente mais recalcitrante dos principais biopolímeros da parede celular vegetal. A lignina é encontrada principalmente na parede celular vegetal secundária e desempenha um papel importante na resistência patogênica, regulação da água e confere força para a integridade da estrutura da parede celular. Os efeitos da lignina em relação a digestibilidade da biomassa têm tido bastante atenção (Pu et al., 2013). Em geral, um baixo teor de lignina na biomassa acarreta uma maior biodisponibilidade do substrato para a produção de bioetanol. No entanto, um estudo recente do Studer et al. (2011), observou vários *Populus* incomuns que não

seguiram o desenvolvimento da liberação de açúcar no teor de lignina. Juntamente com o teor da lignina, outro proeminente fator relacionado com a mesma é o impacto na digestibilidade da biomassa que pode incluir a composição da lignina, suas estruturas químicas e complexo lignina-carboidrato (CLC) na biomassa (Pu et al., 2013).

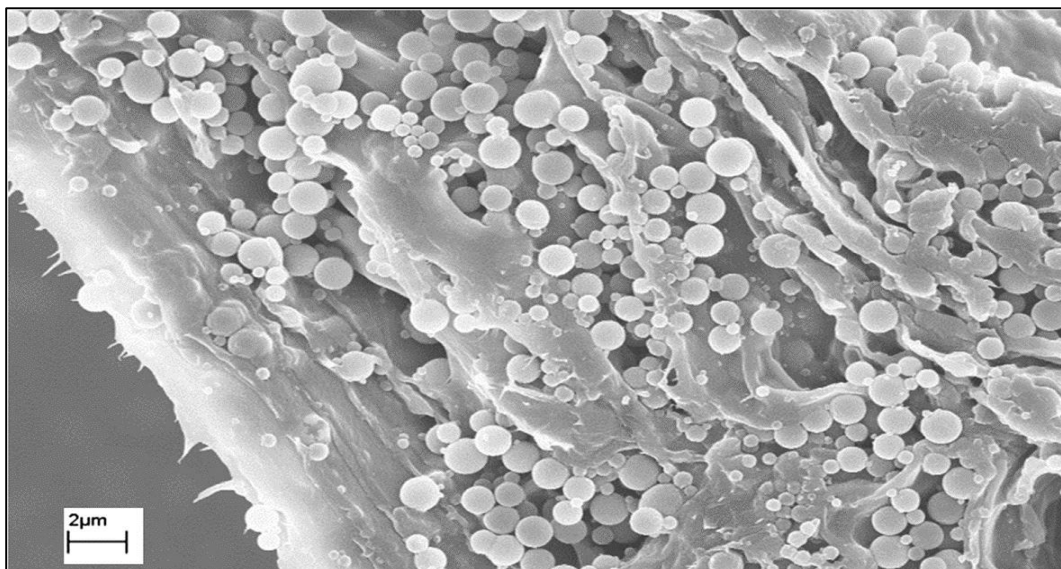
Geralmente, considera-se que a presença da lignina na biomassa restringe a hidrólise enzimática impedindo a acessibilidade da celulase à celulose. O pré-tratamento hidrotérmico pode causar a fragmentação da lignina, frequentemente resultando em uma leve deslignificação da biomassa dependendo do fator de severidade do pré-tratamento. Liu e Wyman (2005) obtiveram menos de 12% de remoção da lignina após o pré-tratamento hidrotérmico (200 °C por 20 min) no sabugo do milho. A remoção da lignina durante o pré-tratamento hidrotérmico tem contribuído para a melhoria da hidrólise da celulose (Pu et al., 2013).

Em contra partida, alguns estudos sugerem que a remoção da lignina não contribui significativamente para a redução da recalcitrância durante o pré-tratamento hidrotérmico e ácido diluído. Estes autores sugerem que poderia haver um equilíbrio entre a remoção da lignina e a necessidade de manter alguma lignina, mantendo a estrutura com um mínimo de alteração/degradação dos polissacarídeos fornecendo uma biomassa pré-tratada ideal para posterior hidrólise enzimática (Kumar et al., 2012; Ding et al., 2012).

DeMartini et al. (2011) investigaram as mudanças na composição da parede celular da biomassa *Populus* durante o pré-tratamento hidrotérmico em diferentes tempos na temperatura de 180 °C e demonstraram que o rendimento de glicose na hidrólise enzimática melhorou, embora obtiveram uma baixa remoção de lignina durante o pré-tratamento hidrotérmico. Os autores relataram que o teor de lignina, por si só não afeta, significativamente, a recalcitrância, mas a integração da lignina e os polissacarídeos dentro da parede celular e suas associações uns com os outros e associação com outros componentes da parede celular, desempenha um papel mais importante que contribui para a recalcitrância da biomassa.

Sannigrahi et al. em 2011 relataram que a desidratação catalisada por ácido dos carboidratos durante o pré-tratamento de ácido diluído foi responsável pela formação da pseudo-lignina. Geralmente, a pseudo-lignina apresenta estruturas esféricas e deposita-se na superfície das células da biomassa pré-tratada, principalmente, após o pré-tratamento com ácido diluído, Figura 12, (Pu et al., 2013).

Figura 12. MEV (microscopia eletrônica de varredura) – Imagem da pseudo-lignina depositada na superfície de *Poplar* holocelulose após pré-tratamento com ácido diluído.



Fonte: Pu et al., 2013.

Outros autores, também estudaram o impacto da pseudo-lignina na hidrólise da celulose e observaram uma menor liberação de açúcar com o aumento do teor da pseudo-lignina, e esse efeito de inibição mostrou ser mais significativo que o da lignina (Hu et al., 2012). Além disso, a lignina ou seus fragmentos foram também relatados na migração para superfície da biomassa lignocelulósica durante o pré-tratamento com ácido diluído, a lignina depositou-se como “droplets” (gotículas) ou “balls” (esferas) na superfície da biomassa (Selig et al., 2007; Pu et al., 2013).

Donohoe et al. em 2008 utilizando técnicas de imagem por MEV relataram que o pré-tratamento com ácido diluído acima da temperatura de fusão da lignina causa a sua coalescência, formando uma massa maior que migra para partes interna e externa da parede celular e, em seguida, é redepositada como gotículas na superfície da parede celular da biomassa. Outro estudo relatou similar pseudo-lignina redepositada como gotículas na superfície da biomassa. Esses autores observaram impactos negativos na hidrólise da biomassa, que foi atribuída ao limitado acesso da enzima à celulose, formando uma barreira física que tende a se ligar de forma irreversível a enzima, embora o mecanismo exato de interação da lignina-celulase ainda não seja claro (Selig et al., 2007). Em alguns estudos a ligação não produtiva da enzima hidrolítica à lignina é um fator importante

que afeta a hidrólise enzimática, mas para outros pesquisadores é um fator insignificante, esse assunto ainda é muito debatido (Pu et al., 2013).

Li et al. em 2007, investigaram o mecanismo de inibição da celulase causado pela gotícula de lignina sobre celulose Avicel e propuseram um efeito de “engarramento” na superfície da Avicel produzida pela mesma, desempenhando um papel importante na inibição da celulase e as ligações não específicas não foram a principal fonte de inibição em alta carga enzimática. Para os autores, a formação da pseudo-lignina e gotícula de lignina redepositada no substrato pré-tratado não são desejáveis devido ao seu efeito inibidor na hidrólise enzimática.

Por outro lado, Donohoe et al. (2008) argumentaram que o processo de migração/relocação da lignina para um mesmo local, ocasionaria uma distribuição da mesma, porém de forma concentrada melhorando a acessibilidade individual das microfibrilas de celulose dentro da parede celular da biomassa. De modo geral, os autores sugerem que a relocação da lignina durante o pré-tratamento hidrotérmico ou ácido diluído seja provavelmente tão importante como a sua remoção para melhorar a digestibilidade. A relocação da lignina pode abrir radicalmente a estrutura da parede celular e melhorar a acessibilidade das microfibrilas de celulose, o que provavelmente explica o mecanismo de melhoria da digestibilidade da biomassa pré-tratada (Pu et al., 2013).

2.5.5 Extrativos

Uma pequena porção da biomassa vegetal é constituída por compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos que não são parte integrante da estrutura celular, estes são chamados de extrativos (Forestry Commission, 2008). É possível extrair estes compostos utilizando solventes polares e não polares, sem degradar a estrutura da biomassa. Alguns exemplos de extrativos: ácidos graxos, ceras, alcalóides, proteínas, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais (Silva, 2009). Os extrativos normalmente constituem de 4 a 10% da massa total seca do material celulósico.

2.6 Pré-tratamentos

Os materiais lignocelulósicos são resistentes à bioconversão, sendo necessário um pré-tratamento para garantir a acessibilidade dos agentes hidrolíticos à celulose. O processo de

produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica demanda a transformação da celulose e hemicelulose em seus respectivos monômeros (glicose e xilose) e posterior conversão dos mesmos a etanol celulósico. O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica consiste em uma das etapas mais importantes em termos de custo, além de influenciar nas etapas subsequentes do processo (Silva, 2011).

O pré-tratamento é requerido para alterar a estrutura da biomassa lignocelulósica tornando mais acessível a celulose para a ação das enzimas. As enzimas convertem os polímeros em açúcares fermentescíveis e esses açúcares serão fermentados por fungos ou bactérias para a produção de etanol celulósico (Moiser et al., 2005; Hendriks e Zeeman, 2009). Os objetivos principais do pré-tratamento são diminuir a cristalinidade da celulose, aumentar a área superficial da biomassa, remover a lignina, diminuir a interação lignina-carboidrato e evitar ou minimizar a formação de inibidores tanto na hidrólise como na fermentação (Moiser et al., 2005; Jönsson et al., 2013).

Um pré-tratamento eficiente consiste em reduzir custos e aumentar a produtividade de bioetanol, por isso, há a necessidade de aumentar a digestibilidade da biomassa e fazer com que a celulose se torne mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis (Hendriks e Zeeman, 2009; Silva, 2011).

Vários métodos de pré-tratamento têm sido sugeridos na literatura. Estes podem ser divididos: em métodos biológicos, físicos, químicos ou uma combinação de todos. Os métodos físicos convertem a biomassa lignocelulósica em pós finos, incrementando a superfície específica da celulose, de modo que a hidrólise da mesma ocorra com relativa facilidade (Moiser et al., 2005). Os métodos químicos objetivam remover a lignina e a hemicelulose sem degradar a cadeia celulósica que deve apresentar propriedades adequadas para as próximas etapas. Como a lignina está ligada às hemiceluloses, uma degradação parcial das hemiceluloses pode ocorrer durante o processo de pré-tratamento, e dependendo das condições empregadas, a celulose também pode ser degradada (Moiser et al., 2005; Silva et al., 2015).

Algumas bases podem ser usadas no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos e o efeito alcalino no pré-tratamento depende da quantidade de lignina presente no material (Fan et al., 1987; McMillan, 1994). Os pré-tratamentos alcalinos utilizam condições moderadas de operações, em termos de temperaturas e pressões, em comparação com sistemas ácidos. O principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra. O álcali,

geralmente cal ou soda, tende a causar um inchamento da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma.

O pré-tratamento utilizando hidróxido de cálcio (“lime”) apresenta vantagens em termos de custo do reagente, segurança do processo e possibilidade de recuperar o álcali sob a forma de carbonato de cálcio mediante reação com dióxido de carbono produzido na etapa de fermentação alcoólica. No entanto, ao contrário da catálise ácida o “lime” pode ocasionar reações irreversíveis na biomassa, formando sais que são incorporados durante o pré-tratamento (Moiser et al., 2005).

A extração alcalina pode também causar a solubilização, redistribuição e condensação da lignina e modificações no estado cristalino da celulose (Gregg e Saddler, 1996). Outro importante aspecto do pré-tratamento alcalino é a alteração da estrutura da celulose que tem forma mais densa e é termodinamicamente mais estável que a celulose nativa (Pettersen, 1984). Li et al. em 2014, obtiveram rendimento em glicose de 64,5% utilizando BCA (400 mesh) pré-tratado hidrotermicamente e seguido de deslignificação com solução de 0,05% de NaOH.

Os ácidos concentrados como o ácido sulfúrico e o ácido clorídrico têm sido utilizados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Embora, sejam agentes poderosos para a hidrólise, os ácidos concentrados são corrosivos, tóxicos e perigosos, porém podem ser recuperados no final do processo (Sivers e Zacchi, 1995). O objetivo principal desse pré-tratamento é solubilizar a hemicelulose e assim, tornar a celulose mais acessível à hidrólise enzimática (Hendriks e Zeeman, 2009).

Os processos de pré-tratamento com ácido diluído conseguem altas taxas de reação e melhoram satisfatoriamente a hidrólise da celulose (Esteghlalian et al., 1997). A hemicelulose solubilizada (oligômeros) pode ser submetida às reações hidrolíticas produzindo monômeros, furfural, HMF e outros produtos (voláteis) em meio ácido (Fengel e Wegener, 1989; Ramos, 2003). Durante o pré-tratamento ácido, a lignina solúvel rapidamente é condensada e precipita em ambientes ácidos (Liu e Wyman, 2003). A solubilização da hemicelulose e a precipitação da lignina solúvel são mais pronunciadas durante o pré-tratamento com ácido concentrado em comparação com o pré-tratamento ácido diluído (Hendriks e Zeeman, 2009).

O método de pré-tratamento com explosão a vapor tem sido muito utilizado em materiais lignocelulósicos (McMillan, 1994). Neste processo o material é submetido a alta pressão saturada 6 a 34 bar e temperatura entre 160 a 240 °C durante um tempo de reação de 1 a 15 min. Após a

reação, o material é submetido a uma rápida descompressão do equipamento e coletado em um tanque de expansão. Durante o pré-tratamento, ocorre hidrólise das hemiceluloses que liberam os carboidratos que podem sofrer degradação térmica e a lignina é parcialmente fragmentada, tornando a estrutura da biomassa mais susceptível à penetração de água, ácidos e enzimas, de modo que o potencial hidrolítico da celulose é incrementado (Sun e Cheng, 2002). O pré-tratamento com explosão a vapor atua química e fisicamente na biomassa lignocelulósica.

Outro tipo de pré-tratamento físico-químico é o AFEX (*Ammonia Fiber Explosion*), que consiste na versão alcalina do processo de explosão a vapor. Nesse caso, os materiais lignocelulósicos são submetidos à ação da amônia líquida (2 kg/kg biomassa seca) em altas temperaturas 160 a 180 °C, sob uma pressão de 9 a 17 bar por um período de tempo entre 10 a 20 min. Em seguida, a pressão é rapidamente reduzida (Sun e Cheng, 2002). A vantagem desse processo está na elevada reatividade da fibra, mínima geração de compostos inibidores da fermentação, além da recuperação da amônia. Entretanto, o AFEX não promove uma elevada solubilização das hemiceluloses, como nos processos ácidos, o que torna difícil a recuperação da mesma no hidrolisado (Holtzaple et al., 1992).

Outro pré-tratamento que tem sido muito relatado emprega amônia aquosa (solução de NH_4OH). O pré-tratamento com amônia aquosa pode ser utilizado em vários tipos de matérias-primas utilizando diferentes processos. A amônia é utilizada como um reagente para remover a lignina. Em altas temperaturas, o pré-tratamento com amônia aquosa resulta em alta deslignificação. No entanto, a sua desvantagem está no alto consumo de energia, formação de compostos tóxicos e perda de açúcares (Kim et al., 2009). Entretanto, estudos têm comprovado que em baixas temperaturas de reação a amônia não é poluente, não é corrosiva e é de fácil manuseio, diminuindo as desvantagens observadas em altas temperaturas. O uso da amônia a temperatura ambiente minimiza a sua interação com a hemicelulose e a formação de componentes tóxicos, aumentando os rendimentos de bioconversão e fermentação (Kim et al., 2009, Silva, 2011). A amônia consegue clivar as ligações C-O-C na lignina e as ligações de éster e éter entre a lignina e a hemicelulose, permitindo que a água penetre nas camadas internas da celulose aumentando a área superficial do material lignocelulósico (Balat et al., 2008).

2.6.1. Pré-tratamento hidrotérmico

Recentemente, o pré-tratamento hidrotérmico tem atraído uma grande atenção pelo fato de usar água pura como solvente. Os mais importantes benefícios do uso da água ao invés do ácido no pré-tratamento é que não há necessidade de processo de recuperação do ácido e eliminação de resíduos sólidos, reduzindo o custo de manutenção do processo. Outros atrativos do pré-tratamento hidrotérmico são significante remoção da hemicelulose com retenção da celulose na biomassa e melhoramento da digestibilidade da celulose pela celulase (Hu et al., 2011).

A água líquida abaixo do ponto crítico é favorecida para realização de reações químicas. A constante de ionização da água aumenta com a temperatura e é cerca de três ordens de grandeza maior do que a da água a temperatura ambiente. Além disso, a constante dielétrica da água diminui com a temperatura. A baixa constante dielétrica da água permite que a água líquida dissolva os compostos orgânicos, enquanto que uma alta constante de ionização da água promove em um meio ácido, a hidrólise da biomassa através da clivagem das ligações de éter e éster favorecendo a hidrólise da hemicelulose (Franck EU, 1998; Savage, 1999; Kumar e Gupta 2009). O ácido acético formado a partir da desacetilação parcial da fração hemicelulósica atuará como catalisador da reação da hidrólise da biomassa lignocelulósica promovendo a despolimerização da hemicelulose (processo autocatalítico) (Kumar et al., 2011; Silva, 2011).

O processo de pré-tratamento hidrotérmico é diferente do explosão a vapor, já que neste último, a biomassa é comprimida com vapor saturado, altas temperaturas (160 a 260 °C) e pressões e, em seguida, este vapor é liberado ocasionando a explosão do material com remoção de hemicelulose, lignina e desfibramento da biomassa (Kumar et al., 2011).

O pré-tratamento hidrotérmico é tipicamente conduzido entre 150 a 220 °C. Dependendo das condições operacionais a hemicelulose é despolimerizada a oligossacarídeos e monômeros, como a xilose. A recuperação desses monômeros a partir da biomassa pode variar entre 88 a 98% (Kumar et al., 2011).

O processo de pré-tratamento hidrotérmico é considerado como uma auto-hidrólise das ligações lignocelulósicas na presença do íon hidroxônio $[H^+]$ gerado a partir da água e grupos acetil liberados a partir da hemicelulose (Akiya et al., 2002). Íons $[H^+]$ produzidos pela ionização da água atuam como catalisador em altas concentrações e temperaturas do que em água a temperatura ambiente proporcionando um ambiente eficaz para a hidrólise ácida (Akiya et al., 2002; Lei et al.,

2013). Além disso, a ruptura física da estrutura lignocelulósica ocorre desde de que altas pressões estejam envolvidas, ocasionando uma diminuição na cristalinidade da celulose, assim como no grau de polimerização (Garrote et al., 1999).

O pH baixo (< 3) pode causar a precipitação da lignina e também catalisar a degradação da hemicelulose. Para evitar a formação de inibidores, o pH deve ser controlado entre 4 e 7 durante o pré-tratamento. Nesta faixa de pH minimiza-se a formação de monossacarídeos e, por conseguinte, a formação de produtos de degradação. Manter o pH perto do neutro (5 a 7) evita a formação de inibidores da fermentação durante o pré-tratamento (Bobleter, 1994; Laxman, 2008; Hendriks e Zeeman, 2009).

Em relação ao pré-tratamento com explosão a vapor, a concentração de produtos solúveis é menor no pré-tratamento hidrotérmico. Em um sistema de fluxo contínuo, o produto é removido continuamente do reator o que reduz o risco de condensação e precipitação da lignina, favorecendo a digestibilidade da biomassa pelas enzimas. A lignina solúvel é muito reativa à temperatura do pré-tratamento e se não for removida rapidamente, parte deste composto se recondensa e precipita na biomassa lignocelulósica (Liu e Wyman, 2003; Rogalinski et al., 2008).

Em 2008, Perez et al. relataram que a melhor condição de pré-tratamento para a palha do trigo foi 188 °C por 40 min alcançando rendimento em glicose de 79,8% após a hidrólise enzimática da palha de trigo tratada. O pré-tratamento hidrotérmico além de apresentar a vantagem de utilizar apenas água como solvente, também evita corrosão de equipamentos, tem ausência de neutralização e reciclagem do ácido (Boussarsar et al., 2009; Saha et al., 2013).

Saha et al. em 2013, investigaram o pré-tratamento hidrotérmico no sabugo de milho. Os autores obtiveram 72% de rendimento teórico em glicose na melhor condição de pré-tratamento (200 °C por 5 min, na razão 10% m/v). Outros autores reportaram condições que foram satisfatórias para a produção de etanol 2G. O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado a 190 °C por 17,2 min utilizando o BCA como matéria-prima. Esses autores alcançaram 50,1% do rendimento teórico em etanol (da Cruz et al., 2012).

Em 2015, Silva et al. utilizando a melhor condição de pré-tratamento hidrotérmico do BCA (195 °C por 10 min, 10% de sólidos (m/m) cominuído a 2 mm) obtiveram recuperação de sólidos de 62,0%. O teor de glucana na fração de sólido foi de 65,8% e xilana de 3,7%. Na produção de etanol os autores alcançaram 29,2 g/L em 72 h de processo SSF empregando a levedura *K. marxianus* IMB3.

A intensidade do pré-tratamento hidrotérmico é calculada pelo fator de severidade, que foi definido por Overend e Chornet em 1987 (Equação 1). O fator de severidade utilizado no estudo do processo hidrotérmico fornece uma maneira fácil de comparar o resultado de vários experimentos realizados sob diferentes condições de temperatura e tempo (Garrote et al., 1999). O fator severidade (R_0) é utilizado para descrever os efeitos causados sobre o substrato e está intimamente relacionado com outros parâmetros usados para fins similares na indústria de óleo (Abatzoglou et al., 1992) ou nos processos de polpação (Chum et al., 1990; Montané et al., 1994; Martínez et al., 1997).

$$R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T(t) - 100}{14,75}\right) \cdot dt \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, t é o tempo de residência em (min) e T é a temperatura em ($^{\circ}\text{C}$) dependente do tempo de residência, considerando o tempo de pré-aquecimento (Rogalinski et al., 2008). Os resultados são apresentados geralmente como uma função de $\log(R_0)$ e as condições ótimas correspondem a uma faixa restrita de $\log(R_0)$. Uma vez que (R_0) depende do tempo e da temperatura, este fator pode ser usado para medir o efeito combinado de ambas as variáveis em um pré-tratamento.

O fator de severidade tem sido utilizado para modelar diversas etapas individuais do processamento químico da biomassa, incluindo a solubilização da hemicelulose (Heitz et al., 1991; Tortosa et al., 1995; Cybuska et al., 2014) e a remoção da lignina (Bouchard et al., 1991; Heitz et al., 1994; Montané et al., 1994; Trajano et al., 2013).

Yang e Wyman (2004) descobriram que o sistema de fluxo contínuo remove mais hemicelulose e lignina do sabugo de milho que o processo em batelada tendo o mesmo fator de severidade. Além disso, a adição de um ácido externo durante o fluxo contínuo causa uma maior remoção da hemicelulose e da lignina, enquanto que no processo de batelada, a adição de um ácido externo causa uma menor remoção de lignina com aumento do tempo de reação e em temperaturas superiores a 200°C a remoção da lignina Klason diminui. Os autores concluíram que a adição do ácido externo causou a solubilização rápida da lignina, mas também causou a sua rápida recondensação. No entanto, há algumas divergências em relação a esses fatos, remoção da hemicelulose e da lignina, alguns autores relatam que apenas a adição de um ácido externo não causaria a solubilização da hemicelulose e da lignina, o ácido não teria efeito real ou não seria o

único fator que afeta a solubilização e que deve haver outras razões para essa solubilização no processo de fluxo contínuo (Bobleter et al., 1991; Jacobsen e Wyman 2002; Liu e Wyman 2003).

2.7 Hidrólises

As tecnologias para obtenção de bioetanol com base em materiais lignocelulósicos envolvem a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis e sua posterior fermentação para a produção do etanol (Bioetanol, 2008). Existem basicamente três técnicas para a obtenção dos açúcares fermentescíveis: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácido diluído e a hidrólise enzimática.

No processo com ácido concentrado a celulose e a hemicelulose são hidrolisadas utilizando ácidos minerais fortes, tais como o ácido sulfúrico, o ácido clorídrico e o ácido fosfórico, em baixas temperaturas e com tempo de reações longos (horas). A desvantagem desta técnica é que requer equipamentos altamente resistentes à corrosão, elevando o custo final da produção do bioetanol, portanto, a recuperação do ácido é fundamental por questões econômicas e ambientais (Bioetanol, 2008).

O processo com ácido diluído utiliza altas temperaturas e pressões, com tempo de reação de segundos a alguns minutos, o que facilita o uso de processo contínuo (Bioetanol, 2008). Neste caso, parte da hemicelulose e da celulose são hidrolisadas separadamente, podendo assim, a hemicelulose ser removida após o primeiro estágio. Devido às altas temperaturas no segundo estágio, uma quantidade considerável de lignina e açúcares solúveis é degradada levando a uma inibição do processo de fermentação.

A hidrólise enzimática da celulose é realizada por enzimas chamadas de celulasas que são altamente específicas (Beguin e Aubert, 1994). Na verdade, a celulase é um complexo enzimático composto por endoglucanases (que hidrolisam as cadeias de celulose para produzir polissacarídeos de menor comprimento), exoglucanases (que hidrolisam os terminais não redutores da cadeia de celulose e removem a celobiose) e β -glicosidades (que hidrolisam a celobiose e outros oligômeros à glicose) (Philippidis e Smith, 1995).

A hidrólise enzimática é um processo realizado em condições mais amenas que a hidrólise ácida. Isto porque, a hidrólise enzimática é conduzida usualmente em condições suaves (pH 4,8 da solução e temperaturas entre 45 a 50 °C), não apresentando problemas de corrosão de

equipamentos. Bactérias e fungos produzem celulases. Esses microrganismos podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos (Sun e Cheng, 2002).

As enzimas celulases hidrolisam a celulose a açúcares redutores, que podem ser fermentados por microrganismos a bioetanol. Porém as celulases são proteínas, e estas não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina, o que torna difícil o acesso dessas enzimas às fibras de celulose, por isso, é de extrema importância um pré-tratamento antes da hidrólise (Fan et al., 1987)

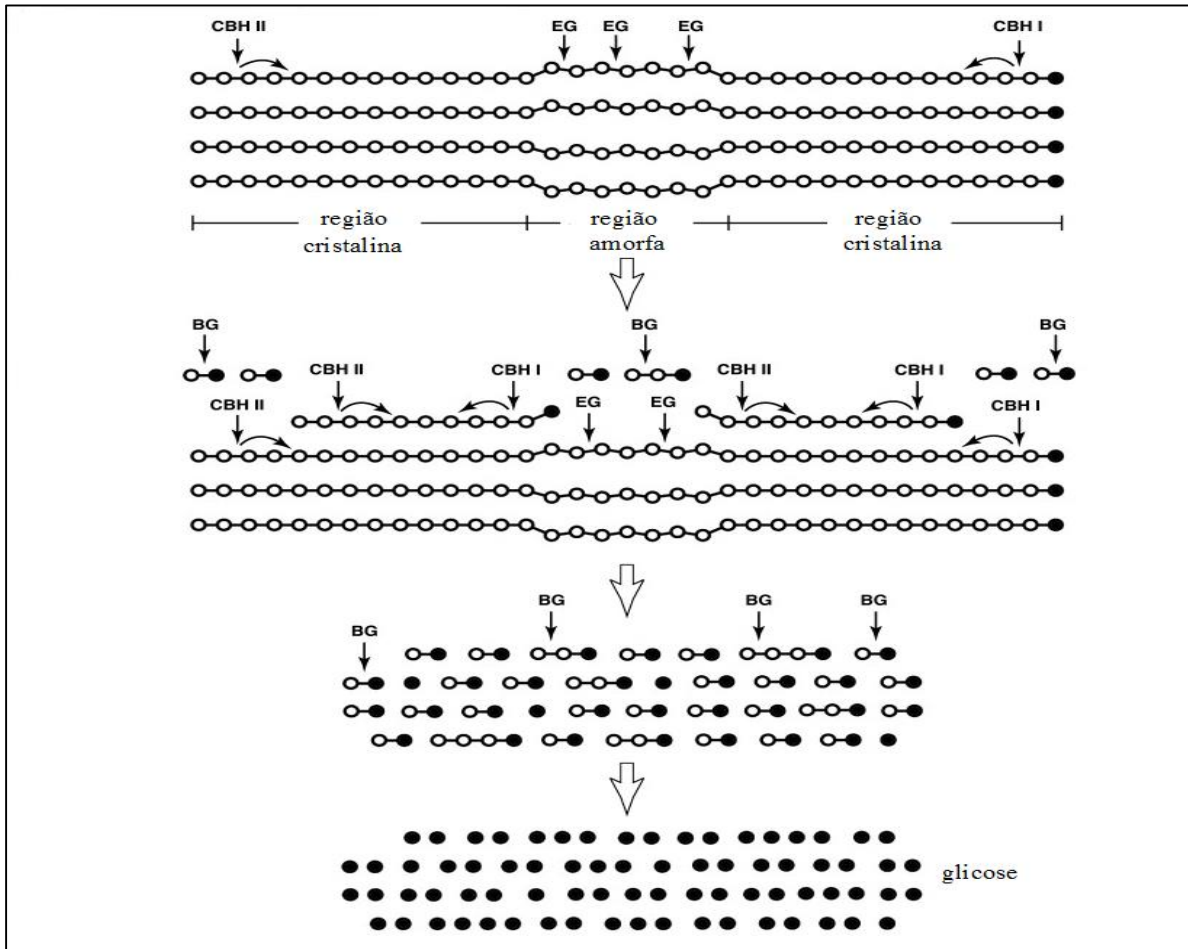
O complexo celulásico como já dito é constituído por três enzimas, as endoglucanases, as celobiohidrolases ou exoglucanases e as β -glicosidases ou celobiasas. E cada tipo de celulase hidrolisa uma região preferencialmente da celulose, como ilustra a Figura 13.

As endoglucanases degradam regiões menos cristalinizadas na fibra da celulose (ligações internas do polímero), produzindo oligossacarídeos e celobiose. Estas enzimas hidrolisam de forma mais ou menos aleatória as ligações β -(1-4)-glicosídicas nas regiões amorfas da celulose ou na superfície das microfibrilas (Sun e Cheng, 2002).

As celobiohidrolases (CBH) ou exoglucosidases atuam nas regiões terminais do polímero da celulose, promovendo a sua despolimerização gradativa através da remoção de unidades de celobiose terminais. Estas enzimas não produzem uma quantidade significativa de novas cadeias terminais na superfície da celulose. A CBH I hidrolisa as unidades de celobiose das extremidades redutoras, enquanto a CBH II hidrolisa as extremidades não redutoras da cadeia (Heikinheimo, 2002). As celobiasas ou β -glicosidases hidrolisam celobiose a glicose, reduzindo o efeito inibidor da celobiose sobre as endo e exoglucanases.

O efeito do complexo celulolítico é expresso pela ação sinérgica dessas três enzimas diferentes sobre a celulase e este sistema complexo de enzimas necessita ser mantido estável para se ter uma atividade catalítica elevada. Em consequência da ação das enzimas endo e exoglucanases sobre a celulose, a celobiose e a glicose são obtidas, e enquanto sua concentração no meio reacional aumenta gradualmente, as atividades das celulases respectivas são inibidas por estes produtos, tendo por resultado uma diminuição final na taxa e no rendimento do processo da sacarificação. A celobiose apresenta um poder de inibição maior no complexo celulolítico do que a glicose (Fan et al., 1987; Heikinheimo, 2002).

Figura 13. Modo de ação do complexo celulásico sobre a celulose.



Fonte: Gusakov, 2011. EG, endoglucanase; CBH I celobiohidrolase I (hidrolisa extremidades reductoras; CBH II, celobiohidrolase II (hidrolisa extremidades não reductoras) e BG, β -glicosidase (hidrolisa celobiose a glicose).

O efeito inibidor da celobiose sobre as celulasas ainda não é muito claro. É difícil descrever o mecanismo de inibição da celobiose por métodos de cinética tradicional devido a insolubilidade e heterogeneidade da estrutura dos materiais celulolíticos e da complexidade da adsorção da celulase na celulose. A exoglucanase (1,4- β -d-glucana celobiohidrolase I, CBH I) é a principal enzima no sistema celulolítico atuando como componente chave para a degradação da celulose (Zhao et al., 2004). A estrutura tridimensional da CBH I tem sido relatada por alguns autores (Lee e Fan, 1983; Divne et al., 1994), porém seu mecanismo de inibição não foi bem compreendido.

Em 2004, Zhao et al. estudaram as diferentes características da adsorção da CBH I nativa e da CBH I ligada a celobiose. Os autores relataram que após a CBH I ligar-se a celobiose forma-se uma adsorção não-produtiva ocasionando a não liberação das microfibrilas da cadeia de celulose. Na literatura, tem-se que o sítio ativo da CBH I apresenta-se na forma de um túnel no domínio catalítico, portanto, só aceita uma única microfibrila e se as microfibrilas não estiverem livres na superfície da celulose a adsorção não ocorre (Xiao et al., 2001).

Outro fator sugerido é a combinação da celobiose com triptofano próximo ao sítio ativo da CBH I. Essa combinação traz automaticamente impedimento estérico na superfície da CBH I que pode provocar o fechamento do túnel cessando a hidrólise enzimática. Os autores reportaram esse tipo de inibição como, reservada, pois quando retira-se a celobiose do meio reacional a hidrólise pode ser ainda reativada (Zhao et al., 2004).

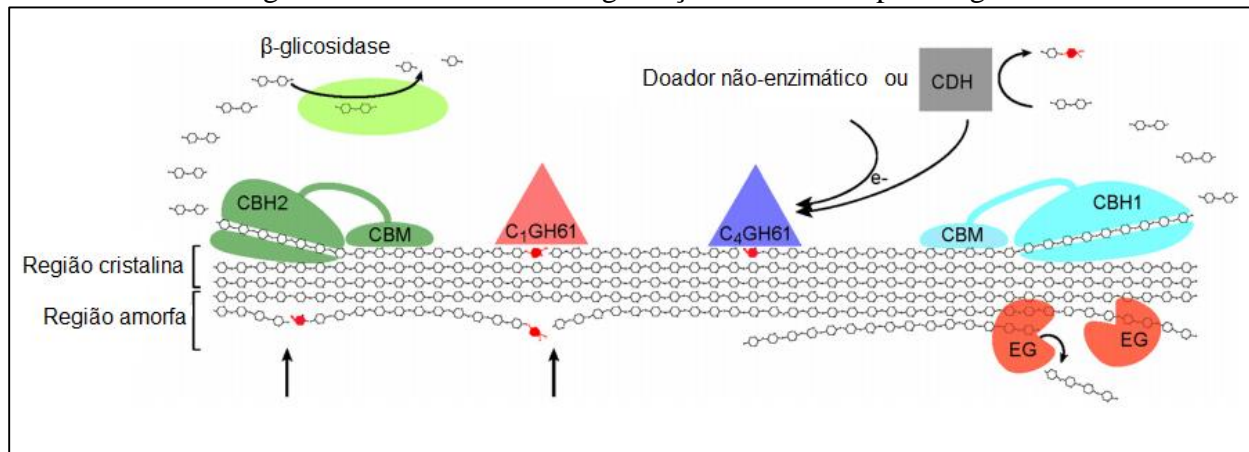
Novas tecnologias para o melhoramento da hidrólise enzimática são necessárias com o intuito de se obter maiores rendimentos com menores custos (Silva et al., 2015). Estudos recentes, sobre proteínas bacterianas, atualmente classificadas como família *Carbohydrate Binding Modules* 33 (CBM33) (Cantarel et al., 2009; Vaaje et al., 2010 e 2012; Forsberg et al., 2011) e proteínas fúngicas denominadas como família *Glycoside Hydrolases* 61 (GH61) (Phillips et al., 2011; Quinlan et al., 2011; Beeson et al., 2012; Li et al., 2012) demonstraram que o esquema de classificação endo/exo pode ser de fato muito simple (Horn et al., 2012).

Essas proteínas têm superfície plana e são capazes de clivar as cadeias polissacarídeas em seu contexto cristalino, utilizando um mecanismo oxidativo que depende da presença de um íon metálico divalente e um doador de elétrons (Vaaje et al., 2010). Os genes que codificam CBM33 e GH61 são abundantes nos genomas de microrganismos de conversão da biomassa e essas enzimas oxidativas representam um novo paradigma para a degradação de polissacarídeos recalcitrantes que podem ser de grande importância para o futuro da biorrefinaria (Horn et al., 2012).

A descoberta da clivagem oxidativa da celulose por monooxigenases de cobre lança um novo paradigma na conversão enzimática (Figura, 14). As celulasas e seus CBMs (módulo de ligações aos substratos) apresentam grandes variações em termos de capacidade para hidrolisar diferentes formas de celulose e similar variação pode ocorrer entre os membros das famílias GH61 e CBM33. Como por exemplo, após a etapa de pré-tratamento, vários tipos de celulose podem ser obtidas resultando em diferentes acessibilidade e susceptibilidade para a celulase (Chundawat

et al., 2011). Portanto, o impacto da adição das enzimas GH61 e CBM33 no coquetel da celulase pode variar dependendo do substrato (Horn et al., 2012).

Figura 14. Mecanismo de degradação da celulose por fungos.



Fonte: Horn et al., 2012. EG, endoglucanase; CBH I celobiohidrolase I (hidrolisa extremidades redutoras, indicado com círculos vermelhos; CBH II, celobiohidrolase II (hidrolisa extremidades não redutoras) e β-glicosidase (hidrolisa celobiose em glicose). CBM, módulo de ligação a carboidrato e CDH celobiose desidrogenase.

A degradação da celulose por enzimas oxidativas inclui a celobiose desidrogenase, que atua na celobiose oxidando o terminal redutor. A CDH tem capacidade de utilizar quinona como aceptor de elétrons interligando os complexos celulolítico e ligninolítico (Kirk e Cullen, 1998). As enzimas GH61 podem causar a hidrólise da celulose pela oxidação das moléculas de anidroglicopiranosose nos carbonos C1 e C4 liberando novos terminais para as CBHs. Contudo, sabe-se que a atuação dessas enzimas depende de um íon cobre, oxigênio molecular e um doador de elétrons. A CDH pode fornecer GH61s juntamente com elétrons, porém deve-se observar que nem todos os organismos têm genes que codificam para essas famílias de enzimas em seu genoma. Além disso, na clivagem do substrato lignocelulósico a enzima GH61 pode obter elétrons devido à degradação da lignina, mostrando a participação da mesma em processos oxirredutores (Horn et al., 2012; Kostylev e Wilson, 2012). Portanto, a descoberta das monooxigenases líticas de polissacarídeos (CBM33 e GH61) podem representar um avanço no processamento enzimático da biomassa, embora mais estudos sejam necessários para estabelecer seu potencial (Horn et al., 2012).

2.8 Processos de hidrólise enzimática e fermentação

O processo de produção de etanol 2G inclui basicamente os seguintes passos: pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e destilação. O sucesso do processo utilizado depende muito do rendimento global de etanol produzido (volume de etanol produzido por massa seca da biomassa) e da alta concentração de etanol no meio. Concentrações de etanol superiores a 4% (v/v) contribuem para diminuir a demanda de energia na etapa de destilação, tornando a produção de etanol 2G a partir da biomassa mais economicamente viável (Wingren et al., 2003; García-Aparicio et al., 2011).

A quantidade de etanol originado na etapa de fermentação depende principalmente da produção de açúcar produzido durante a hidrólise enzimática. Altas concentrações de substrato conduzem a elevadas concentrações de açúcares no hidrolisado, que são preferíveis na etapa de fermentação. A utilização de altas cargas de sólidos também contribui para a redução dos custos global de produção como consequência do baixo consumo de água e do menor processamento de recuperação e purificação (Banerjee et al., 2009). Porém, o aumento da carga de sólidos acarreta em algumas dificuldades que restringem a carga de sólidos máxima, tais como, inibição do produto final pela glicose e celobiose para as enzimas, limitação da transferência de massa, e se a completa biomassa hidrolisada for utilizada grandes quantidades de inibidores são gerados durante o pré-tratamento, sendo que alguns desses inibidores são tóxicos às leveduras (García-Aparicio et al., 2011; Silva et al., 2015).

A hidrólise enzimática e a fermentação da biomassa lignocelulósica podem ser realizadas em diferentes configurações de processos, tais como, sacarificação e fermentação separadas (SHF, sigla em inglês de *Separate Hydrolysis and Fermentation*), sacarificação e fermentação simultâneas (SSF, sigla em inglês de *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) e pré-sacarificação e fermentação simultâneas (PSSF, sigla em inglês de *Pre-Saccharification prior to Simultaneous Saccharification and Fermentation*) (Ruiz et al., 2012; Silva et al., 2015).

A ideia de realizar a hidrólise enzimática e fermentação simultâneas foi apresentada por Gauss et al. na patente de 1976. Os autores relataram que a produção de glicose na configuração SHF (utilizando enzimas produzidas por *Trichoderma reesei*) foi baixa, provavelmente devido à inibição dos produtos finais da hidrólise, glicose e celobiose. Os autores então, mostraram em sua patente que obtiveram maior produção total de etanol quando utilizaram SSF. Gauss et al.

atribuíram esse fato pela remoção da glicose e celobiose do meio devido a consequente liberação do açúcar, seguida pela sua fermentação, diminuindo assim, o efeito da inibição pelo produto (Olofsson et al., 2008).

Gauss e colaboradores relataram que uma das vantagens do processo SSF é que se evita uma potencial perda de glicose, pois não existe a separação da hidrólise e fermentação. Além disso, reduz-se também o número de reatores a serem utilizados, diminui-se assim, os custos do processo. Outras vantagens relacionam-se com o consumo de hexoses e pentoses e a desintoxicação tem sido relatada em recentes estudos (Alriksson et al., 2011; Jönsson et al., 2014).

A principal desvantagem do processo SSF quando comparado ao SHF é que tipicamente, a temperatura do processo é inferior ao ótimo das enzimas celulolíticas (cerca de 50 °C). No processo SHF, a temperatura da hidrólise enzimática pode ser otimizada para o ótimo das enzimas independente da temperatura de fermentação. Além disso, na SSF a levedura pode não ser reutilizável devido a dificuldades operacionais de separação da levedura com a biomassa hidrolisada (Olofsson et al., 2008; García-Aparicio et al., 2011).

A produção de etanol em processo SSF pode também ser melhorada utilizando leveduras termotolerantes, como a *Kluyveromyces marxianus*, que pode fermentar etanol em temperaturas próximas à temperatura ótima de atuação das celulasas, entre 38 a 45 °C (Pessani et al., 2011). Além disso, a aplicação de altas temperaturas pode levar à redução dos custos do etanol produzido em larga escala, incluindo a redução dos custos de resfriamento e riscos de contaminação. A utilização de altas temperaturas melhora também a performance da sacarificação enzimática com subsequente redução de dosagens de enzimas (Babiker et al., 2010).

No processo SSF, a produção de etanol a partir do hidrolisado lignocelulósico sugeri a utilização de leveduras termotolerantes. Esses microrganismos devem ser também tolerantes ao etanol produzido e aos inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa (Öhgren et al., 2006). A quantidade e o tipo de inibidores variam com o tipo de biomassa lignocelulósica. Por isso, a tolerância da levedura a esses inibidores depende do material lignocelulósico utilizado. Várias alternativas de desintoxicação (isto é, remoção dos compostos inibidores) tem sido relatadas, como por exemplo, supercalagem (Ca(OH)_2 , método mais comumente utilizado), extração líquido-líquido, extração sólido-líquido, aquecimento e evaporação, tratamento microbiano e catálise enzimática (lacase e peroxidase) (Larsson et al., 1999; Palmqvist e Hahn-Hagerdal, 2000; Cantarella et al., 2004; Jönsson et al., 2013). Porém, uma objeção comum contra a desintoxicação

baseia-se no pressuposto que seria necessário a separação desse processo antes da hidrólise e fermentação (Jönsson et al., 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que a utilização de altas cargas de sólidos ocasiona vários problemas, incluindo pobre agitação do substrato e alta concentração de inibidores causando a inibição da levedura e em alguns casos inibe também a enzima (Mohagheghi et al., 1992; Hoyer 2013). Silva et al. em 2015, utilizando processo em batelada com 15% de sólidos e carga enzimática de 30 FPU de celulase/g de BCA tratado obtiveram um rendimento de 58,9% de etanol com o auxílio de esferas metálicas na agitação do processo SSF. Outros autores, relataram rendimento de 65,1% de etanol empregando 16% de BCA tratado com explosão a vapor e suplementação de xilanase (enzima xilanase, hidrolisa xilose - SSCF, sacarificação e co-fermentação simultâneas) (Amores et al., 2013).

A heterogeneidade causada pela mistura inadequada do material tem sido abordada de diferentes maneiras. Diferentes tipos de reatores, tais como, reator de liquefação e fermentador simples tem sido projetado e fabricado para a utilização do processo SSF. Anteriores trabalhos, mostraram empregando a palha de trigo com carga de sólidos de 32% (m/m) ou maior obtiveram satisfatórios rendimentos em etanol (Mohagheghi et al., 1992; Jorgensen et al., 2007). No entanto, o projeto de reatores especializados é, frequentemente, caro e pode restringir sua funcionalidade dependendo da matéria-prima (Koppram e Olsson, 2014).

Uma das alternativas é a utilização de reatores convencionais em batelada alimentada do substrato e/ou enzima em processo de SSF para superar os desafios ao trabalhar com altas cargas de sólidos. A batelada alimentada de SSF tem apresentado em muitas ocasiões ser benéfica em vários aspectos incluindo: (a) facilidade de mistura após sacarificação parcial, que resulta na capacidade de adição de mais substrato pouco a pouco no procedimento, (b) baixo consumo de energia devido a baixa viscosidade, (c) baixa concentração de compostos inibidores facilitando a fermentação pelas leveduras e (d) baixa concentração de glicose no meio (Koppram et al., 2013; Koppram e Olsson, 2014).

Em recente estudo, o potencial da batelada alimentada (SSF) com alimentação de substrato e enzima utilizando *S. cerevisiae* recombinante (fermentação de açúcares C6 e C5) em escala piloto empregando biorreator convencional com 10% de pré-tratado de sabugo de milho alcançou-se 4% (m/v) de etanol (Koppram et al., 2013). A alimentação de levedura também tem sido investigada devido ao fato de ser a peça chave no processo SSF e utilizando altas cargas de sólidos pode ser

submetida a altas concentrações de inibidores que afetam a viabilidade celular, o crescimento, rendimento e produtividade em etanol (Koppram et al., 2013; Koppram e Olsson, 2014).

Recentemente, muitos autores têm investigado a pré-sacarificação antes da SSF, processo denominado de PSSF (Hoyer et al., 2013; Amores et al., 2013; Koppram e Olsson, 2014). A aplicação da PSSF tem sido proposta devido à redução da viscosidade da biomassa hidrolisada quando utiliza-se altas cargas de sólidos (Öhgren et al., 2007; García-Aparicio et al., 2011). Outra vantagem da PSSF é a hidrólise parcial da celulose antes da adição da levedura que pode ocasionar um aumento na taxa de produção de etanol no início da SSF (Lin e Tanaka, 2006). E outro aspecto importante da PSSF é facilitar a mistura durante a fermentação, especialmente em altas cargas de sólidos (Amores et al., 2013; Koppram e Olsson, 2014).

Outros autores reportaram utilizando BCA pré-tratado com explosão a vapor com 20% de sólidos, 20 FPU de celulase/g BCA tratado e suplementado com xilanase 64,3% de rendimento de etanol em 72 h de SSCF sendo 24 h de pré-sacarificação (Amores et al., 2013). Hoyer et al. (2013) relataram a pré-hidrólise a 48 °C por 22 h de *spruce* pré-tratado com explosão a vapor obtiveram um aumento na concentração final de etanol 3,0 para 48,0 g/L com 13,7% de sólidos.

Em processo SHF a levedura pode ser reciclada após a fermentação do hidrolisado, o que não é possível no processo SSF. A levedura representa, portanto, uma perda de rendimento, uma vez que é difícil sua separação a partir do resíduo sólido da lignina (Olofsson et al., 2008). Para aumentar o rendimento em etanol no processo SHF tem sido utilizada a co-fermentação, ou seja, a utilização da fração C5 do material lignocelulósico.

Na SHCF (sacarificação e co-fermentação separadas) promove-se um aumento no teor de açúcares no meio hidrolisado, favorecendo o aumento no rendimento em etanol. Em 2012, Erdei et al. estudaram a SHCF no farelo de trigo pré-tratado com explosão a vapor. Os autores relataram que a hidrólise da fração sólida utilizando 18,5% de substrato com 14 FPU de celulase/g glucana alcançaram concentrações de 101,7 g/L de glicose e 19,9 g/L de xilose em 120 h. Na fermentação em batelada alimentada do hidrolisado da fração sólida na fração líquida do pré-tratado os autores obtiveram cerca de 60,0 g/L de etanol com 7,0% de sólidos.

Em geral, o melhoramento da SSF ou de qualquer outra opção de processo está relacionado com a obtenção de altos rendimentos da hidrólise enzimática e da alta concentração de etanol produzido. Sem dúvida, o desenvolvimento de enzimas mais eficientes e leveduras mais robustas acarretaram em melhores resultados no processo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para facilitar o entendimento das informações contidas nessa tese, os materiais e métodos foram divididos em 9 tópicos principais:

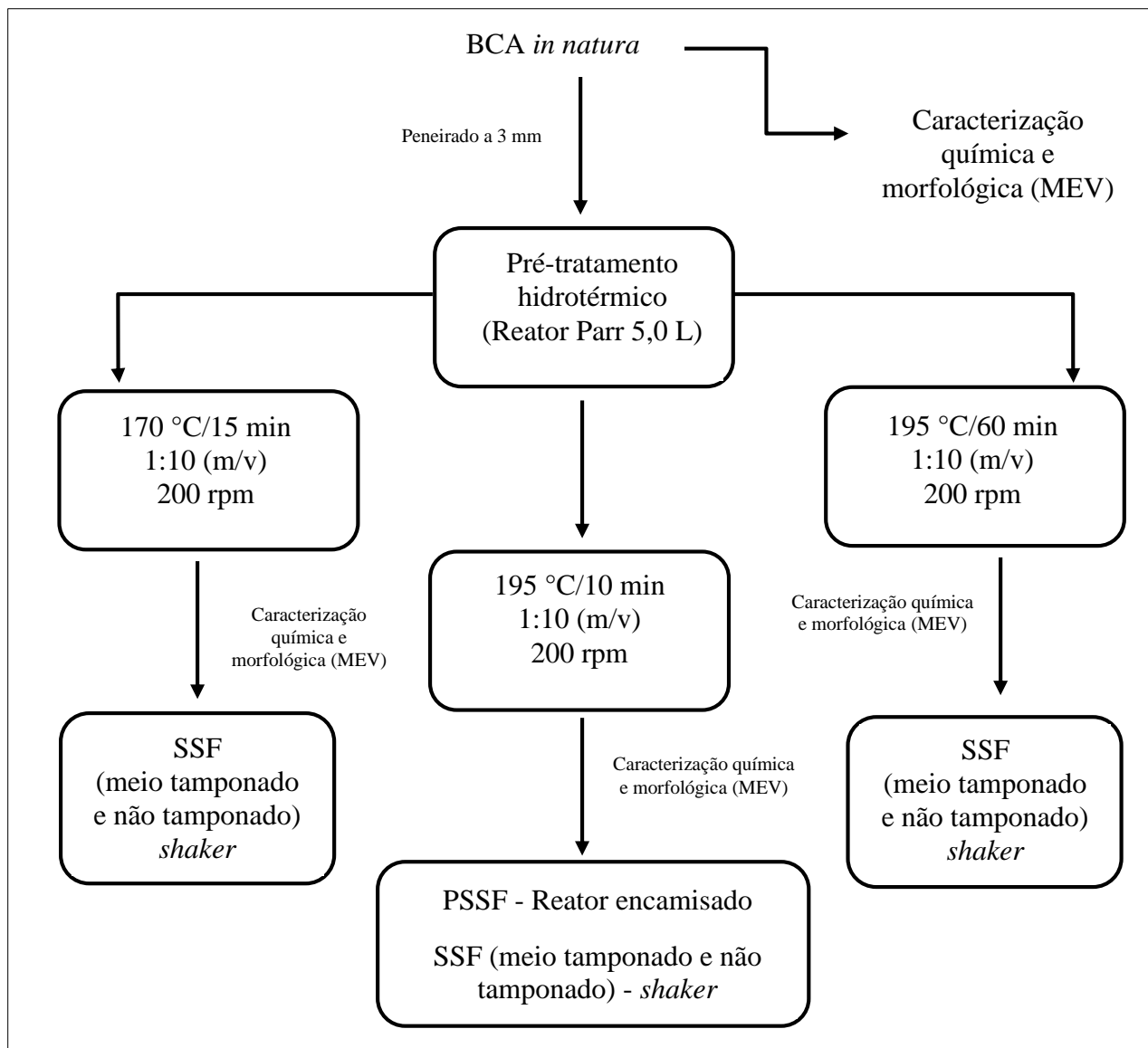
1. Fluxogramas do projeto (item 3.1);
2. Bagaço de cana-de-açúcar (BCA) (item 3.2);
3. Enzimas (item 3.3);
4. Microrganismos (item 3.4);
5. Pré-tratamento do BCA (item 3.5);
6. Caracterização química do BCA (item 3.6);
7. Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (item 3.7);
8. Hidrólise enzimática e fermentação do BCA (item 3.8);
9. Experimentos desenvolvidos no Departamento de Engenharia de Biosistemas e Agricultura da Universidade Estadual de Oklahoma no laboratório ATRC (item 3.9).

As representações esquemáticas dos procedimentos experimentais são apresentadas nos fluxogramas das Figuras 15, 16 e 17.

3.1 Fluxogramas do projeto

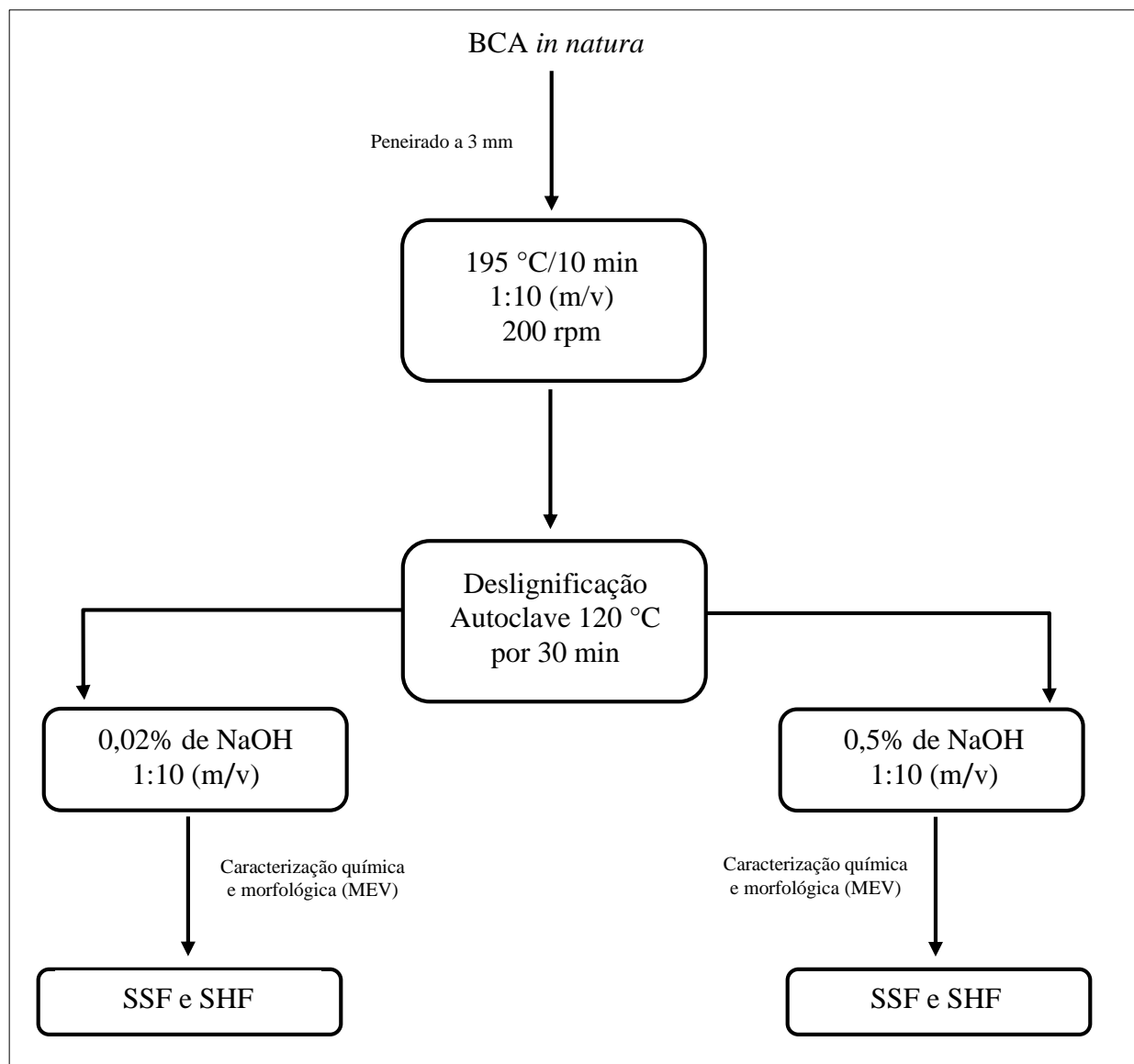
Diferentes condições operacionais de pré-tratamento hidrotérmico foram avaliadas utilizando como material lignocelulósico o bagaço de cana-de-açúcar (BCA) *in natura*. A Figura 15, apresenta o fluxograma das etapas empregadas no presente trabalho.

Figura 15. Fluxograma das etapas envolvidas no estudo do pré-tratamento hidrotérmico das amostras de BCA *in natura*.



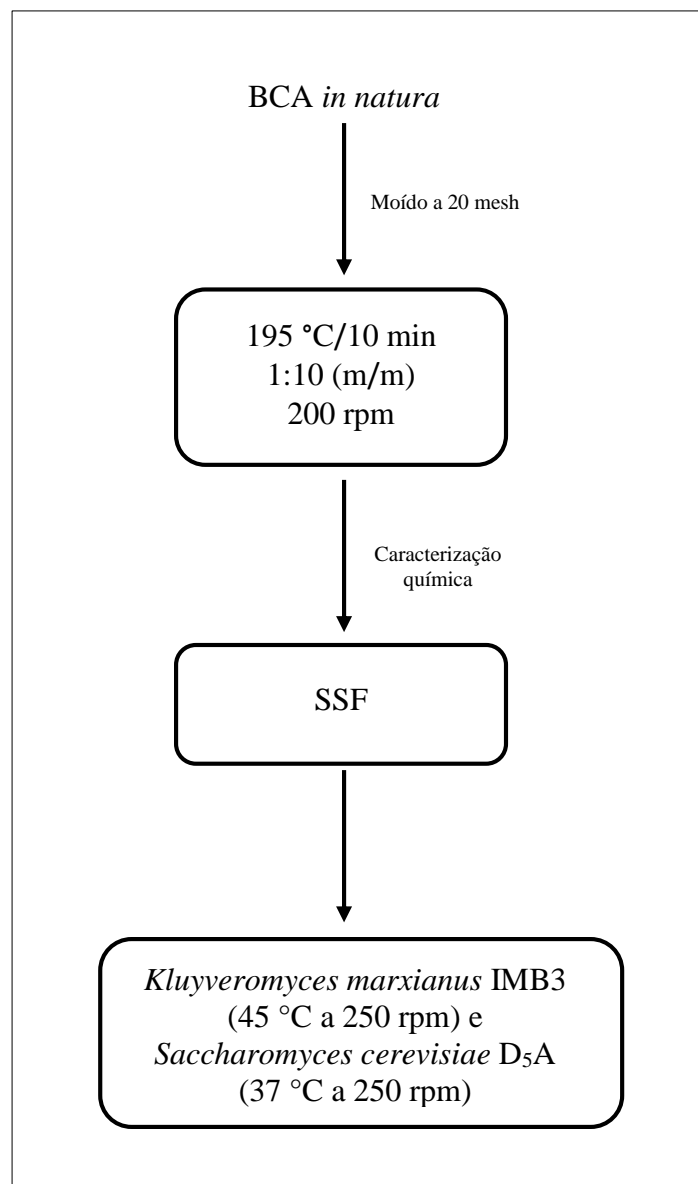
O BCA tratado a 195 °C por 10 min foi deslignificado com 0,02 e 0,5% de solução de hidróxido de sódio (NaOH), como mostra a Figura 16.

Figure 16. Fluxograma da deslignificação com solução de NaOH do BCA pré-tratamento hidrotérmico a 195 °C/10 min.



Uma parte dos estudos dessa tese foi realizada no grupo de pesquisa do Departamento de Engenharia de Biosistemas e Agricultura da Universidade Estadual de Oklahoma (Stillwater, OK, EUA) sob supervisão do professor Dr. Mark R. Wilkins. Os trabalhos desenvolvidos referiram-se ao tema “Sacarificação e fermentação simultânea do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotêrmicamente utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* IMB3”. Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório Advanced Technology Research Center (ATRC). A Figura 17 apresenta a sequência dos experimentos realizados.

Figura 17. Fluxograma dos experimentos realizados no laboratório ATRC.



3.2 Bagaço de cana-de-açúcar (BCA)

O bagaço de cana-de-açúcar (Figura 18) utilizado nesse projeto foi gentilmente cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, Piracicaba, SP). Nesse trabalho o BCA *in natura* foi moído a 20 mesh apenas para a caracterização química (moinho de facas tipo Willye, Labor - modelo SP-30). Nos experimentos de pré-tratamentos a amostra de BCA *in natura* foi peneirada em uma malha de 3 mm. As umidades das amostras dos BCAs antes e após os pré-tratamentos foram determinadas com o auxílio de um determinador de umidade (Marte, modelo ID50).

Figura 18. Fotografia da amostra de BCA *in natura*.



3.3 Enzimas

Neste trabalho utilizou-se o complexo enzimático celulásico comercial (Accellerase 1500), gentilmente cedida pela empresa DuPont, Genencor A Danisco Division, EUA.

A atividade do extrato enzimático foi determinada experimentalmente pelo método de Ghose (1987) obtendo-se o valor de 74 FPU/mL (substrato papel de filtro Whatman nº 1) para a Accellerase 1500.

Tendo em vista, o desenvolvimento de novos complexos enzimáticos, utilizou-se também na melhor condição experimental obtida durante o doutorado o complexo enzimático Cellic CTec2, cedido pela empresa Novozymes A/S Denmark, com atividade 201 FPU/mL (substrato papel de filtro Whatman nº 1), método de Ghose (1987).

3.4 Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos experimentos de fermentações alcoólicas foram as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Empregou-se duas linhagens nos experimentos com *S. cerevisiae*: forma liofilizada SA-1 e linhagem comercial (marca Fleischman). Para os experimentos realizados no laboratório ATRC, utilizou-se a linhagem selecionada *K. marxianus* IMB3. Para comparação dos resultados obtidos nesse laboratório utilizou-se também a *S. cerevisiae* D₅A.

3.5 Pré-tratamento do BCA

A Figura 19 ilustra o reator utilizado nos experimentos de pré-tratamento hidrotérmico do BCA *in natura*.

Figura 19. Fotografia do reator de 5,0 L Parr Instrument Company, 4580 HP/HT.



As amostras de BCAs foram pré-tratadas em um reator de aço com volume de 5,0 L (Parr Instrument Company, modelo 4580 HP/HT) equipado com manta aquecedora, controlador de temperatura e agitação. Os pré-tratamentos hidrotérmicos dos BCAs foram realizados nas condições de 170 °C /15 min, 195 °C/10 min e 195 °C/60 min na proporção 1:10 (massa seca de BCA por volume de água) com agitação de 200 rpm.

Nos experimentos realizados no laboratório ATRC, utilizou-se um reator de bancada de 1,0 L (Parr Instrument Company, 4520, Moline, IL, EUA) equipado com aquecimento, agitação e controlador de temperatura. O BCA *in natura* foi pré-tratado a 195 °C/10 min na proporção 1:10 (massa seca de BCA por massa de água) com rotação de 200 rpm (Figura 20).

Figura 20. Fotografia do reator utilizado nos ensaios realizados no ATRC.



3.5.1 Pré-tratamentos hidrotérmicos

Amostras de BCA *in natura* foram pré-tratadas na proporção de 1 g de BCA/10 mL de água deionizada nas condições de 170 °C /15 min, 195 °C/10 min e 195 °C/60 min a 200 rpm. Pesou-se 100,0 g massa seca de BCA e colocou-se no reator e adicionou-se 1,0 L de água deionizada. Em seguida, o reator foi ligado na temperatura desejada e permaneceu pelo tempo requerido sob agitação de 200 rpm. Após o término da reação, o reator foi esfriado até a temperatura de 60 °C. O material tratado foi filtrado e o pré-hidrolisado foi armazenado, analisando-se o pH e anotando o volume final do hidrolisado. Lavou-se por três vezes o BCA tratado com 1,0 L de água destilada morna (± 60 °C). Determinou-se a umidade das amostras para calcular o rendimento da recuperação dos sólidos (Equação 2) e armazenou-as na câmara fria em sacos herméticos, para posterior caracterização química em teores principais de celulose, hemicelulose, lignina solúvel e insolúvel. Em seguida, as amostras foram hidrolisadas enzimaticamente e fermentadas, de acordo com as diferentes configurações de processo.

$$R (\%) = \left(\frac{\text{massa}_{\text{final pré-tratada}}}{\text{massa}_{\text{inicial}}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 2})$$

3.5.2 Pré-tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação com NaOH

O BCA *in natura* foi pré-tratado hidrotérmicamente a 195 °C/10 min com agitação de 200 rpm na proporção 1:10 (m/v). O material após o primeiro pré-tratamento foi filtrado e, em seguida, a fração sólida foi deslignificada com solução de hidróxido de sódio (NaOH). As concentrações das soluções foram 0,02 e 0,5% de NaOH. O material tratado hidrotérmicamente foi deslignificado na proporção 1:10 (m/v) em autoclave a 120 °C por 30 min. Após o tempo de reação, o BCA deslignificado com 0,02% de NaOH foi lavado três vezes com volume de 500 mL de água deionizada (± 60 °C). O BCA tratado com 0,5% de NaOH foi lavado até pH 7,0. Determinou-se a umidade dos BCAs deslignificados e calculou-se o rendimento dos pré-tratamentos conforme Eq. (2). Em seguida, armazenou-os em sacos plásticos herméticos na câmara fria para posterior caracterização química, hidrólise enzimática e fermentação, de acordo com as diferentes configurações de processo.

3.6 Caracterização química do BCA

A amostra de BCA *in natura* foi caracterizada de acordo com procedimento descrito por Gouveia et al., 2009 com adaptações. O material foi cominuído em moinho de facas para obter-se uma granulometria de 20 mesh. Primeiramente, para o BCA *in natura* determinou-se a quantidade de extrativos. A fração líquida do BCA tratado foi caracterizada de acordo com procedimento padrão NREL (Sluiter et al., 2008).

3.6.1 Extrativos

Adicionou-se 4,0 g (massa seca) de BCA *in natura* em um cartucho e colocou-se em um sistema de extração (Soxhlet - Diogolab). Adicionou-se em um balão de fundo redondo 360,0 mL de etanol 95%. Ajustou-se a manta para fornecer um ciclo mínimo de 6 sífões por hora. Refluxou-se por 16 horas. O líquido contendo os extrativos foi colocado em rotaevaporizador até se obter um líquido viscoso. Retirou-se esse líquido utilizando um pouco de etanol. Colocou-se em uma placa de Petri, previamente, tarada e deixou-se na capela ligada até se obter massa constante. Calculou-se a massa de extrativo do BCA *in natura*.

3.6.2 Hidrólise ácida

Em um tubo de ensaio adicionou-se 10,0 mL de solução de ácido sulfúrico 72% e colocou-se em banho-maria a 45 °C (tampou-se o tubo de ensaio com papel alumínio). Em um béquer de 100 mL adicionou-se 1,0 g de bagaço com 10% de umidade e colocou-se o béquer em banho-maria a 45 °C. Adicionou-se o ácido sulfúrico no béquer e mexeu-se com um bastão de vidro por 10 minutos. A reação foi finalizada adicionando-se 50,0 mL de água destilada ao béquer. O conteúdo foi transferido quantitativamente para um Erlenmeyer de 500 mL e adicionou-se 225,0 mL de água destilada. O Erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado por 30 minutos a 1 bar a 120 °C. Filtrou-se o conteúdo do Erlenmeyer em papel de filtro qualitativo (previamente, pesado e seco em estufa a 100 °C) diretamente em um balão volumétrico de 500 mL. O filtrado foi analisado por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). A fração sólida retida no papel de filtro foi lavada com 1.500 mL de água destilada, tomando-se o cuidado de lavar bem as bordas

do papel. Em seguida, o papel de filtro foi deixado na capela por uma noite (adaptado de Gouveia et al., 2009).

3.6.3 Determinação da lignina solúvel

Em um balão volumétrico de 100 mL transferiu-se 5,0 mL do hidrolisado e adicionou-se 40 gotas de hidróxido de sódio 6,5 mol/L completando o volume com água destilada. Tomou-se uma alíquota desta solução e mediu-se a absorvância a 280 nm empregando cubeta de quartzo (espectrofotômetro Pharmacia Biotech- Ultrospec 2000). Como branco foi empregado água destilada. A lignina solúvel foi determinada pela Equação 3 (Rocha et al., 1997).

$$C_{\text{lig}} = 4,187 \cdot 10^{-2} \cdot (A_T - A_{\text{pd}}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

C_{lig} : concentração de lignina solúvel em (g/L);

A_T : absorvância da solução de lignina com os produtos de degradação;

$$A_{\text{pd}} = c_1 \cdot \epsilon_1 + c_2 \cdot \epsilon_2$$

c_1 e c_2 , são as concentrações de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) respectivamente, determinadas por CLAE.

$$\epsilon_1 = 146,85 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ (furfural)}$$

$$\epsilon_2 = 114,00 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ (HMF)}$$

3.6.4 Determinação da lignina insolúvel

A lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klason, Rocha et al., 1997. O papel de filtro contendo a fração sólida (após ter ficado uma noite na capela) foi transferido para um pesa-filtro (previamente, pesado) e colocado em estufa a 100 °C até obter-se massa constante. A porcentagem de lignina na amostra foi calculada pela Equação 4.

$$\%L = \left(\frac{M_k - M_c}{M_A} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

L: lignina Klason em (%);

M_K: massa de lignina insolúvel;

M_c: massa de cinzas da lignina;

M_A: massa da amostra seca.

3.6.5 Determinações das cinzas da lignina e do BCA

Após ter-se obtido massa constante do papel de filtro, esse foi transferido para um cadinho de porcelana, previamente pesado e colocado em uma mufla a 150 °C por 30 minutos. Em seguida, aumentou-se a temperatura para 250 °C, e deixou-se por 20 minutos. Por fim, incinerou-se o papel de filtro a 800 °C por 2 horas. Para determinar as cinzas do BCA pesou-se 1,0 g de bagaço (base seca) e colocou-se em um cadinho, previamente tarado e procedeu-se da mesma forma utilizada para o papel de filtro (adaptado de Rocha et al., 1997). Calculou-se a quantidade de cinzas contida na lignina e do BCA de acordo com a Equação 5.

$$\% \text{ cinzas} = \left(\frac{M_c}{M_a} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

% cinzas: cinzas em (%);

M_c: massa de cinzas (massa do cadinho com cinzas – massa do cadinho vazio);

M_A: massa da amostra seca.

3.6.6 Determinações de carboidratos e ácidos orgânicos

As concentrações de açúcares e ácidos orgânicos foram determinadas por CLAE. Foram construídas curvas de calibração dos ácidos orgânicos (a partir de soluções padrão de ácido acético,

ácido fórmico e ácido glucurônico), e dos carboidratos (a partir de soluções padrão de glicose, xilose, celobiose e arabinose). As amostras dos hidrolisados foram filtradas em membrana de 0,45 µm e analisadas por CLAE (Gouveia et al., 2009). Condições experimentais: coluna HPX-87H Aminex (Bio-Rad, Organic Acid Analysis column, 300 x 7,8 mm) fase móvel de solução de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) 0,005 mol/L, vazão de 0,6 mL/min, temperatura do forno (CTO-10A) 45 °C, tempo de retenção 18 min e detector de índice de refração RID-10A, em cromatógrafo Shimadzu.

Calcularam-se os teores de celulose e hemicelulose utilizando os fatores de conversão proposto em Gouveia et al. em 2009. Celulose: 0,90 x massa de glicose, 0,95 x massa de celobiose, 1,20 x massa de HMF e 3,09 x massa de ácido fórmico. Para a hemicelulose: 0,88 x massa de xilose, 0,88 x massa de arabinose, 0,72 x massa de ácido acético e 1,37 x massa de furfural.

3.6.7 Determinações de hidroximetilfurfural e de furfural

Para determinar as concentrações de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural foram realizadas análises cromatográficas (CLAE). Construíram-se curvas de calibração de furfural e hidroximetilfurfural injetando soluções padrões destes dois compostos. As amostras dos hidrolisados foram filtradas em membrana de 0,45 µm e analisadas (Gouveia et al., 2009). Condições experimentais: coluna C-18 (Waters, 3,9 x 300 mm), fase móvel de solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de solução de ácido acético, vazão de 0,8 mL/min, temperatura do forno 25 °C, tempo de retenção 10 min e detector UV/VIS (SPD-10A) a 274 nm, em cromatógrafo Shimadzu.

3.7 Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas na Embrapa Instrumentação de São Carlos – SP, em equipamento JSM-6510/JEOL. As amostras do BCA *in natura* e pré-tratadas com granulometria menor que 100 mesh foram secas em estufa a 60 °C. Fixou-se as mostras em suporte de alumínio com fita dupla face de carbono. E posteriormente, as amostras foram submetidas ao recobrimento com ouro Sputter Coater SCD050/Leica com uma camada aproximadamente de 20 nm e, em seguida, foram colocadas em um dessecador até o momento das análises.

3.8 Hidrólise enzimática e fermentação do BCA

3.8.1 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL em *shaker* (Solab, modelo SL- 221) a 32 °C com agitação de 200 rpm por 16 horas. O inóculo foi constituído de 5,0 g/L de extrato de levedura, 10,0 g/L de peptona, 25,0 g/L de glicose e 2,0 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*. Terminado o tempo de reação, o meio foi centrifugado em tubos Falcon de 45 mL a 6.000 rpm por 10 min. Retirou-se o sobrenadante e suspendeu-se o inóculo com tampão citrato (50 mM, pH 4,8). Adicionou-se em cada frasco 0,5 mL de inóculo com densidade ótica (D.O) específica para cada experimento. Calculou-se a D.O de acordo com a Equação 6 (Dowe e McMillan, 2008).

$$V_T = \left(\frac{V_h \text{ (mL)} \times 0,5}{D.O_f} \right) \times (N + 1) \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde:

V_T : volume total de inóculo em (mL);

V_h : volume de hidrolisado em (mL);

$D.O_f$: Densidade ótica final;

N : número de frasco hidrolisados.

3.8.2 Preparo do meio de fermentação

O meio de fermentação foi preparado em um balão volumétrico de 250 mL. O meio foi constituído de 5,0 g/L extrato de levedura, 3,0 g/L de peptona, 2,5 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 1,0 g/L de fosfato de dipotássio (K_2HPO_4) e 5,0 g/L de sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$.

3.8.3 Análises por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE)

A concentração de glicose e etanol foram determinadas por CLAE (coluna HPX-87H, Bio-Rad), fase móvel de ácido sulfúrico 0,005 mol/L, vazão de 0,6 mL/min, temperatura do forno a

45 °C, tempo de retenção 30 min e detector de índice de refração RID-10A, em cromatógrafo Shimadzu. Os padrões utilizados foram celobiose, glicose, xilose, arabinose, glicerol, ácido acético e etanol. As alíquotas retiradas nos experimentos foram filtradas em membrana de celulose de 0,2 µm e armazenadas para análise de cromatografia líquida. A conversão enzimática da celulose (CC) foi calculada de acordo com a Equação 7.

$$CC = \frac{M_{glicose} \times f_h}{M_{inicial} \times y_i} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

$M_{glicose}$: massa de glicose presente no BCA hidrolisado;

$M_{inicial}$: massa seca do BCA;

f_h : fator de conversão da celulose (item 3.6.6);

y_i : teor de celulose no BCA.

O rendimento em etanol foi calculado de acordo com o procedimento padrão NREL (Dowe e McMillan, 2008), como mostra a Equação 8.

$$Et_r = \frac{Et_f - Et_0}{0,51f[BCA] \times 1,11} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:

Et_r : rendimento do etanol em (%);

Et_f : concentração de etanol final em (g/L);

Et_0 : concentração de etanol no início da fermentação em (g/L);

[BCA]: concentração de BCA seco no início da fermentação em (g/L);

f : fração de celulose no BCA seco;

0,51: fator de conversão da glicose a etanol;

1,11: fator de conversão da celulose a glicose.

3.8.4 Ensaio de pré-sacarificação e fermentação simultânea (PSSF)

Os primeiros ensaios de hidrólise enzimática e fermentação foram realizados em processo PSSF. Os experimentos das amostras de BCA pré-tratada a 195 °C/10 min foram realizados em reatores encamisado de 100 mL. Pesou-se 5,0 g de BCA seco e adicionou-se uma solução de 50 mL de tampão citrato pH 4,8 (50 mM) com 20 FPU de Accellerase 1500/g BCA tratado. Realizou-se a pré-sacarificação por 12 h a 300 rpm a 50 °C. Em seguida, reduziu-se a temperatura para 35 °C, adicionou-se o inóculo com D.O de 1,0 (levedura SA-1) e realizou-se a SSF por 24 h. Durante o experimento foram retiradas alíquotas e filtradas em membrana de celulose 0,2 µm e congeladas para posterior análise de CLAE. Ensaio realizado em duplicata.

3.8.5 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

✓ Meio não tamponado

Os experimentos de SSFs foram realizados empregando amostras de BCA tratadas hidrotérmicamente a 170 °C/15 min, 195 °C/10 min e 195 °C/60 min. As condições das SSFs foram: 10% de BCA seco com carga enzimática de 20 FPU de Accellerase 1500/g BCA tratado em *shaker* com agitação de 250 rpm a 37 °C por 72 h em frascos de Erlenmeyers de 250 mL. Adicionou-se 5,0 mL de tampão citrato pH 4,8 (50 mM), 2,5 mL de meio de fermentação, 4,0 mL de inóculo (levedura comercial) com (D.O 3,0) e água deionizada em cada frasco até obter massa total de 50,0 g. Durante os experimentos alíquotas foram retiradas, filtradas em membrana 0,2 µm e analisadas por CLAE. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

✓ Meio tamponado

Os ensaios de SSFs foram realizados com amostras de BCA tratadas hidrotérmicamente a 170 °C/15 min, 195 °C/10 min e 195 °C/60 min. As SSFs foram realizadas em frascos de Erlenmeyers de 250 mL com 10% de BCA seco e carga enzimática de 20 FPU de Accellerase 1500/g BCA tratado em *shaker* com agitação de 250 rpm a 37 °C por 72 h. Adicionou-se 5,0 mL de meio de fermentação, 0,5 mL de inóculo (levedura comercial) com D.O final de 3,0 e tampão

citrato pH 4,8 (50 mM) em cada frasco até obter massa total de 50,0 g. Durante os experimentos, retirou-se alíquotas para análise por CLAE. Essas alíquotas foram filtradas em membrana de celulose 0,2 µm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.8.6 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) em diferentes cargas de sólidos

Os ensaios de SSFs foram realizados com amostras de BCA tratadas a 195 °C/10 min seguido por deslignificação com 0,02 e 0,5% de solução de hidróxido de sódio (NaOH). Nesses experimentos avaliou-se o efeito da carga de sólidos. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com agitação de 250 rpm a 37 °C por 72 h na proporção de 10 e 15% de sólidos com carga enzimática de 20 FPU de Accellerase 1500/g BCA tratado. Adicionou-se microesferas metálicas nos ensaios com 15% de sólidos para ajudar na dissolução do BCA. Nos frascos continham: 5,0 mL de meio de fermentação, 0,5 mL de inóculo (levedura comercial) com D.O final de 3,0 e 50 mM de tampão citrato pH 4,8 até obter massa total de 50,0 g. Alíquotas foram retiradas durante os experimentos e filtradas em membrana de 0,2 µm para posterior análise de CLAE.

3.8.7 Sacarificação e fermentação separadas (SHF)

Realizou-se experimentos de hidrólise enzimática e fermentação separadas (SHF). Nesses ensaios de SHFs empregou-se as amostras de BCA tratadas a 195 °C/10 min seguido por deslignificação com 0,02 e 0,5% de solução de hidróxido de sódio (NaOH). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Os ensaios de SHFs foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. As hidrólises foram conduzidas a 50 °C com agitação de 250 rpm por 72 h. As cargas de sólidos utilizadas foram de 10 e 15% e a enzimática foi de 20 FPU de Accellerase 1500/g BCA tratado. Adicionou-se tampão citrato pH 4,8 (50 mM) até massa total de 50,0 g. Nos experimentos com 15% de sólidos adicionou-se microesferas metálicas para ajudar na dissolução do BCA tratado. Terminada a hidrólise enzimática, filtrou-se o BCA hidrolisado e fermentou-o com 0,5 mL de inóculo (levedura

comercial) com D.O final de 10,0 e 1,0 mL de meio de fermentação. As fermentações foram realizadas a 32 °C com agitação de 250 rpm por 3,5 h. Alíquotas foram retiradas, filtradas em membrana 0,2 µm e analisadas por CLAE.

3.8.8 Comparação de enzimas em processo SSF

Tendo em vista, o estudo de novos complexos celulásicos utilizou-se o complexo enzimático Cellic CTec2 da Novozymes na melhor condição experimental de pré-tratamento hidrotérmico em processo SSF, para comparar com a enzima Accellerase 1500 (DuPont) utilizada em todo o doutorado. Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com agitação de 250 rpm a 37 °C por 72 h utilizando 10% de sólidos e carga enzimática de 20 FPU/g BCA tratado. Adicionou-se 5,0 mL de meio de fermentação, 0,5 mL de inóculo (levedura comercial) com D.O final de 3,0 e 50 mM de tampão citrato pH 4,8 até massa total de 50,0 g. Alíquotas foram retiradas durante os ensaios e filtradas em membrana de celulose 0,2 µm para análise de CLAE.

3.9 Experimentos desenvolvidos no Departamento de Engenharia de Biosistemas e Agricultura da Universidade Estadual de Oklahoma no laboratório ATRC

3.9.1 Pré-tratamento hidrotérmico

O BCA foi pré-tratado hidrotérmicamente na proporção 1:10 (m/m) a 200 rpm utilizando um reator de bancada de 1,0 L. O reator foi carregado com 60,0 g de BCA seco. Em seguida, adicionou-se água deionizada até alcançar a proporção de 10% de sólidos. O reator foi fechado e aquecido até 195 °C com agitação. A temperatura de 195 °C foi mantida por 10 min. Após o tempo de reação, o reator foi resfriado em um banho de gelo até a temperatura de 40 °C. Separou-se a fração sólido/líquido por filtração a vácuo utilizando papel de filtro Whatman # 5. A fração sólida foi lavada três vezes com volume de 600,0 mL de água deionizada a 60 °C para a remoção dos açúcares solúveis e/ou inibidores da fermentação. Uma amostra de 5 a 6 g do BCA tratado foi seca por 24 h em uma estufa a 105 °C para a determinação da umidade. O material tratado foi armazenado em saco plástico hermético na câmara fria para posterior caracterização química, hidrólise enzimática e fermentação.

3.9.2 Preparos do inóculo e do meio de fermentação

As leveduras *K. marxianus* IMB3 e *S. cerevisiae* D₅A foram inoculadas em um meio que continha 10,0 g/L de extrato de levedura, 20,0 g/L de peptona e 50,0 g/L de glicose. Um laço de levedura foi transferido para um frasco Baffled de 250 mL devidamente esterilizado e adicionou-se 100,0 mL do meio preparado. Em seguida, a levedura foi incubada a 45 °C (*K. marxianus* IMB3) ou a 37 °C (*S. cerevisiae* D₅A) com agitação de 250 rpm por 17 h. As células foram coletadas e centrifugadas a 4.000 rpm por 6 min. O sobrenadante foi decantado e lavado duas vezes com 0,89% de cloreto de sódio (NaCl) esterilizado e, em seguida, foi ressuspensionado com a mesma solução estéril. Adicionou-se em cada frasco de SSF 0,5 mL de inóculo com D.O 5,0 e 0,5 para IMB3 e D₅A, respectivamente, utilizando a Equação 6 (item 3.8.1).

O meio de fermentação foi preparado com 5,0 g/L de extrato de levedura, 20,0 g/L de fosfato de dipotássio (K₂HPO₄), 10,0 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O), 20,0 g/L de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ e 1,0 g/L de sulfato de magnésio monohidratado (MnSO₄.H₂O). O meio de fermentação foi autoclavado por 30 min a 120 °C.

3.9.3 Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)

As SSFs foram realizadas em frascos Baffled fechados com uma rolha de borracha acoplada com uma válvula de saída única (Check valve, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) para manter o ambiente anaeróbio.

Os ensaios foram realizados em quatro condições: (a) 10% (m/m) BCA seco/15 FPU/g BCA tratado, (b) 10% (m/m) BCA seco/30 FPU/g BCA tratado, (c) 15% (m/m) BCA seco/15 FPU/g BCA tratado e (d) 15% (m/m) BCA seco/30 FPU/g BCA tratado. Cada frasco de SSF continha 5,0 mL de meio de fermentação, 2,5 mL de 1,0 M citrato de sódio pH 5,5 e 0,5 mL de inóculo. Adicionou-se água deionizada em cada frasco até obter massa total de 50,0 g.

Os experimentos foram conduzidos a 45 e 37 °C para *K. marxianus* IMB3 e *S. cerevisiae* D₅A, respectivamente, em *shaker* (MaxQ mini 4450, Thermo Scientific, Dubuque, IA, EUA) com agitação de 250 rpm por 168 h. Nos ensaios contendo 15% de sólidos adicionou-se microesferas de metal para ajudar na dissolução dos BCAs. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas e centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min. As frações líquidas foram filtradas em membrana de nylon de 0,45 µm (VWR International, West Chester, PA, EUA) e congeladas para análises futuras de CLAE. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.9.4 Análises das amostras de SSF por CLAE

As concentrações de glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol foram medidas por CLAE. 10 µL das amostras foram analisadas usando a coluna Aminex HPX-87H (BioRad, Hercules, CA, EUA) com detector índice de refração (Agilent, 1100 series, Santa Clara, CA, EUA). As condições da coluna foram: fase móvel de 0,01 N de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄), vazão de 0,6 mL/min, temperatura do forno a 60 °C e tempo de retenção de 30 min.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do BCA *in natura*

Inicialmente, o BCA *in natura* foi submetido a ensaios experimentais de caracterização química como descrito no item 3.6. Amostras do material em base seca foram caracterizadas quimicamente e os resultados são apresentados na Tabela 3, em composição percentual dos seus principais constituintes. Os resultados mostraram que o BCA apresenta uma grande quantidade de celulose ($40,8 \pm 1,6\%$), seguido pela hemicelulose com ($24,5 \pm 0,8\%$) e a lignina total ($23,2 \pm 2,8\%$). O alto teor de celulose contido no BCA indica que o material apresenta grande potencial para a conversão enzimática sendo, portanto, um material que pode ser utilizado para a produção de etanol 2G.

Tabela 3. Composição química da amostra de BCA *in natura*.

Componentes (%)	BCA <i>in natura</i>
Celulose	$40,8 \pm 1,6$
Hemicelulose	$24,5 \pm 0,8$
Lignina solúvel	$5,5 \pm 1,3$
Lignina insolúvel	$17,7 \pm 1,5$
Cinzas	$5,4 \pm 1,1$
Extrativos	$5,7 \pm 0,4$
Total	99,6

Os resultados obtidos da composição química do BCA *in natura* foram comparados com um trabalho descrito na literatura (Gouveia et al., 2009), como mostra a Tabela 4. A partir dos dados apresentados na Tabela 4, observou-se que os principais componentes do BCA (celulose, hemicelulose e lignina total) estão de acordo com os resultados obtidos na literatura. Estudo anterior relatou a composição do BCA sendo 42,8% em celulose, 25,8% em hemicelulose e 22,1% em lignina total (Gouveia et al., 2009). Em 2012, Santos et al. descreveram a composição média dos principais componentes do BCA *in natura* variando entre 32-48% de celulose, 19-24% de

hemicelulose e 23-32% de lignina total. Portanto, os resultados obtidos nos experimentos corroboram com os relatados na literatura.

Tabela 4. Comparação da caracterização química do BCA *in natura*.

Componentes (%)	BCA <i>in natura</i>	BCA <i>in natura</i> (Gouveia et al., 2009)
Celulose	40,8 ± 1,6	42,8
Hemicelulose	24,5 ± 0,8	25,8
Lignina Total	23,2 ± 2,8	22,1
Cinzas	5,4 ± 1,1	1,4
Extrativos	5,7 ± 0,4	6,1
Total	99,6	98,5

4.2 Caracterização química e morfológica dos BCAs pré-tratamentos hidrotermicamente

O BCA, assim como outros materiais lignocelulósicos, é constituído principalmente de celulose, hemicelulose, lignina e pequenas quantidades de extrativos e sais minerais. E seus componentes estruturais estão distribuídos em uma estrutura lamelar, o que dificulta a acessibilidade das enzimas a celulose, por isso, tem-se a necessidade de um pré-tratamento para aumentar a acessibilidade da celulose e diminuir a sua cristalinidade (Carrasco et al., 2010 e Gao et al., 2014).

As amostras de BCA *in natura* foram pré-tratadas hidrotermicamente em três condições: 170 °C/15 min, 195 °C/10 min e 195 °C/60 min. No pré-tratamento hidrotérmico utiliza-se água pura como solvente. A água sobre alta pressão e temperatura pode penetrar na biomassa lignocelulósica, promovendo a hidratação da celulose e a remoção da hemicelulose e uma parte da lignina, dependendo das condições operacionais (Hu et al., 2011; Chandra et al., 2012). Na Tabela 5 apresentam-se os resultados obtidos do fator de severidade, pH e da recuperação de sólidos dos pré-tratamentos hidrotérmicos. No fator de severidade, avalia-se a intensidade do pré-tratamento hidrotérmico combinando as duas variáveis tempo e temperatura (Cybulska et al., 2014).

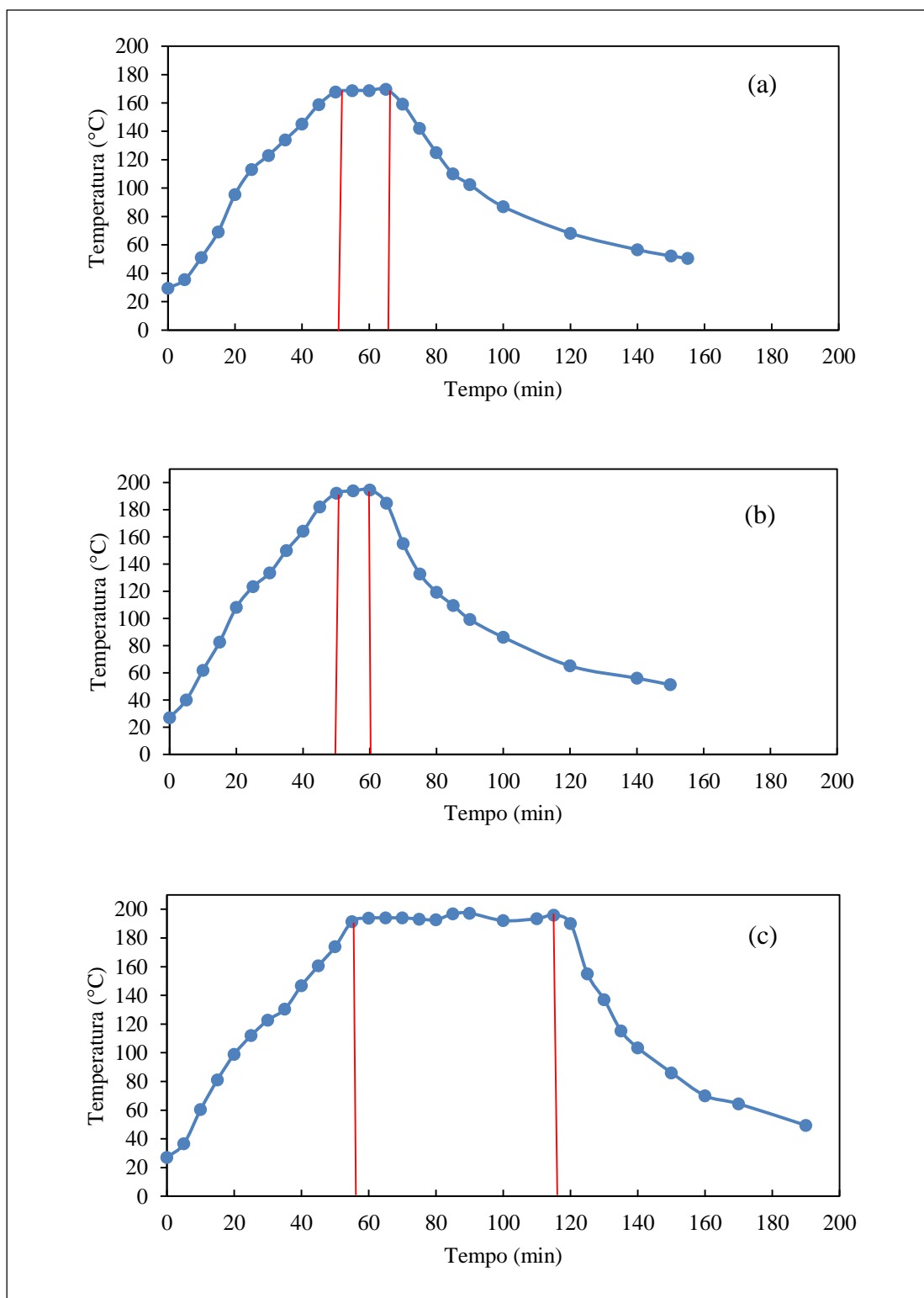
Tabela 5. Dados do fator de severidade, pH e recuperação de sólidos dos BCAs.

Pré-tratamentos	Fator de severidade	pH final	Recuperação de sólidos (%)
170 °C/15 min	3,4	4,6	72,0
195 °C/10 min	4,1	4,0	63,4
195 °C/60 min	4,6	3,8	54,9

A observação dos dados mostrou que com o aumento do fator de severidade do pré-tratamento ocorreu uma redução da recuperação de sólidos. De modo geral, a temperatura tem um efeito importante na eficácia do pré-tratamento, produzindo fibras altamente digestivas. O tempo de residência tem uma menor influência no pré-tratamento e é frequentemente relacionado como um fator menos significativo na modelagem estatística (Yu et al., 2010). O fator de severidade ideal sugerido por Aita e Kim (2010) deve estar entre 3,0 e 4,5 para a máxima digestibilidade das fibras produzidas, correspondendo aproximadamente a temperaturas entre 160-210 °C para um tempo de processamento entre 10 e 30 min. Os fatores de severidades dos pré-tratamentos realizados estão nessa faixa apresentada, com exceção da condição 195 °C/60 min que foi de 4,6 com pH final de 3,8 e apresentou a menor recuperação em massa 54,9%. Essas observações devem-se ao alto tempo de residência desse pré-tratamento, o dobro do máximo ideal (Aita e Kim, 2010). Com o aumento do tempo de reação, uma maior quantidade de ácidos orgânicos pode ser liberada a partir da hemicelulose, provocando uma maior acidez do meio. E a redução na recuperação do sólido nesse pré-tratamento pode ter sido ocasionada pela ruptura da cadeia polimérica da celulose, diminuindo o grau de polimerização da cadeia (Fengel e Wegener, 1989).

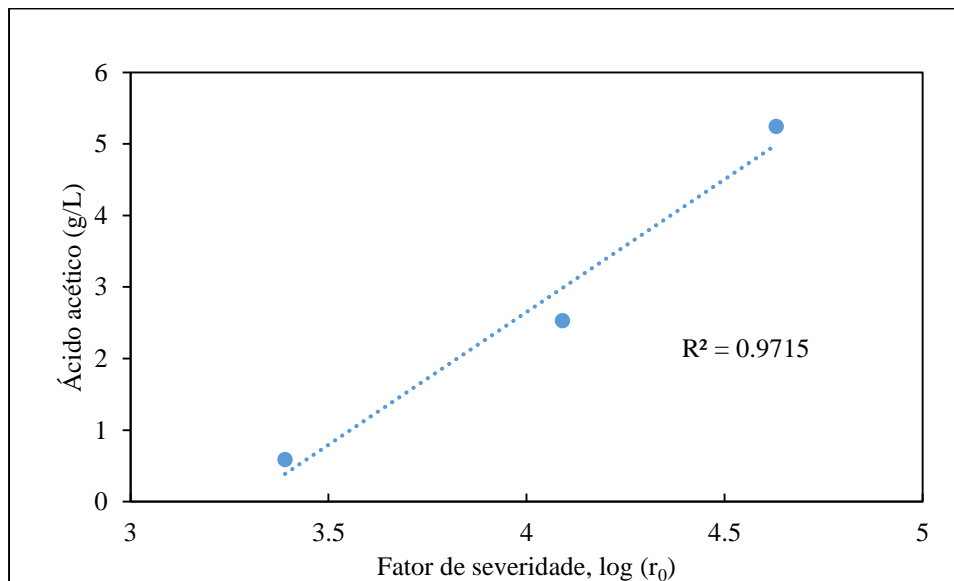
Na análise do perfil das rampas de aquecimento e resfriamento (Figura 21), observou-se que os tempos de permanência da temperatura nos pré-tratamentos foram mantidos durante o tempo requerido para as condições 170 °C/15 min e 195 °C/10 min. Para a condição 195 °C/60 min houve uma pequena variação da temperatura entre os tempos de 85-90 min (197 °C). A rampa de aquecimento levou em média de 50 a 55 min. E as rampas de resfriamento levaram em média 60 min (60 °C) para poder abrir o reator em todas as condições avaliadas. Altos tempos de resfriamento propiciam a recondensação da lignina solúvel, levando a formação da pseudo-lignina que se deposita na superfície das fibras lignocelulósicas, elevando o teor da lignina residual (Trajano et al., 2013).

Figura 21. Rampas de aquecimento e resfriamento da etapa de pré-tratamento das amostras de BCAs tratadas, (a) 170 °C/15 min, (b) 195 °C/10 min e (c) 195 °C/60 min.



Análises por CLAE mostraram que o pré-hidrolisado (fração líquida) do pré-tratamento a 195 °C/60 min gerou 5,2 g/L de ácido acético, ou seja, uma quantidade significativa de ácido acético foi liberada a partir da hemicelulose. Nos tratados a 170 °C/15 min e 195 °C/10 min apresentaram 0,6 e 2,5 g/L de ácido acético, respectivamente. Na análise do gráfico (Figura 22) observou-se que com o aumento do fator de severidade tem-se uma maior tendência na formação de ácido acético. A liberação do ácido acético no pré-tratamento hidrotérmico é consequência da hidrólise do grupo acetil a partir da hemicelulose (Saha et al., 2013). Esses dados obtidos confirmam os valores de pHs apresentados na Tabela 5. Na fração líquida as concentrações de furfural foram < 0,8 g/L e HMF < 0,04 g/L para todas as condições avaliadas. A formação dos produtos de inibição furfural e HMF são a partir da degradação dos açúcares pentose e hexose, respectivamente (Jönsson et al., 2013).

Figura 22. Influência do fator de severidade na liberação de ácido acético nos BCAs tratados.



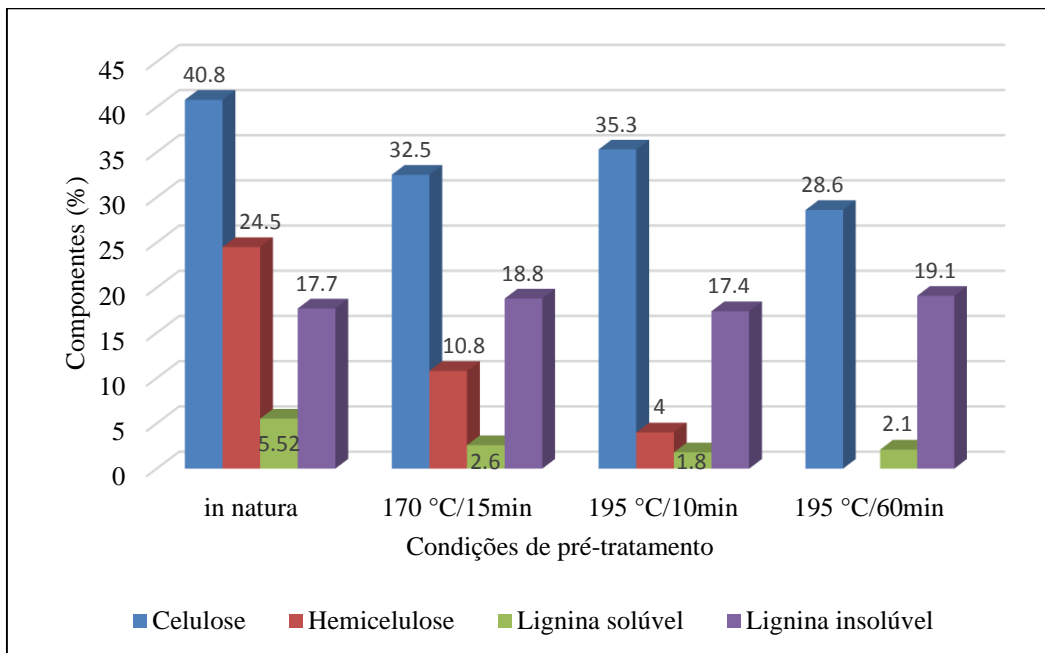
Os BCAs tratados foram caracterizados quimicamente e morfologicamente. A Tabela 6 apresenta os teores dos principais constituintes das amostras de BCA pré-tratados hidrotérmicamente e a Figura 23 apresenta a quantidade percentual desses componentes após o pré-tratamento hidrotérmico.

Tabela 6. Caracterização química dos BCAs pré-tratados hidrotêrmicamente.

Componentes (%)	<i>in natura</i>	170 °C/15 min	195 °C/10 min	195 °C/60 min
Celulose	40,8 ± 1,6	45,2 ± 0,3	55,7 ± 0,8	52,2 ± 1,0
Hemicelulose	24,5 ± 0,8	15,0 ± 0,2	6,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Lignina solúvel	5,5 ± 1,3	3,6 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,9 ± 0,5
Lignina insolúvel	17,7 ± 1,5	26,1 ± 1,1	27,4 ± 2,2	34,8 ± 0,7
Cinzas	5,4 ± 1,1	6,0 ± 0,7	4,3 ± 0,1	8,2 ± 0,1
Extrativos	5,7 ± 0,4	-	-	-
Total	99,6	95,9	96,6	99,2

A recuperação de sólidos dos pré-tratados 170 °C/15 min, 195 °C/10 min e 195 °C/60 min foram 72,0, 63,4 e 54,9%, respectivamente.

Figura 23. Quantidade percentual dos componentes recuperados após o pré-tratamento hidrotérmico do BCA.

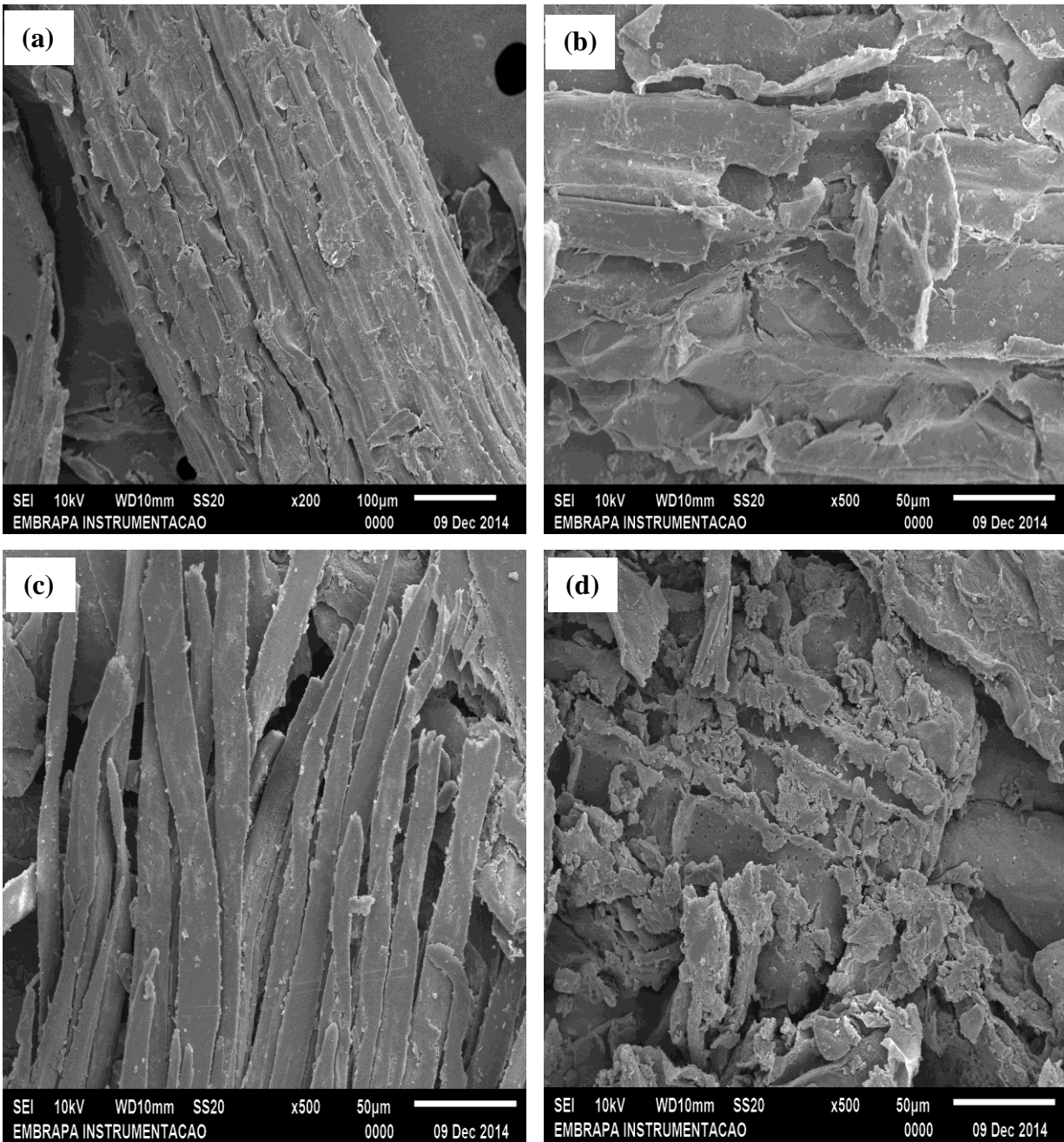


A partir dos dados apresentados na Tabela 6 observa-se uma considerável remoção de hemicelulose a medida que o fator de severidade aumenta. A maior concentração de celulose obtida foi para o pré-tratado a 195 °C/10 min cerca de 55,7%, que também foi a condição com menor perda de celulose cerca de 13,5% (Figura 23). Oliveira et al. em 2014 utilizando palha de cana-de-açúcar na condição 195 °C/10 min (hidrotérmico) obteve satisfatório rendimento em celulose (62,2%), porém sua recuperação de sólidos foi de 47,7%.

O BCA tratado a 195 °C/60 min apresentou apenas traços de hemicelulose, no entanto, foi a condição com maior perda de celulose (30,0%). As amostras 170 °C/15 min e 195 °C/10 min apresentaram também satisfatórias remoções de hemiceluloses cerca de 55,9 e 83,7%, respectivamente, como mostra a Figura 23. A lignina recuperada no pré-tratado (fração sólida) foi maior que o teor de lignina no BCA *in natura*, em todas as condições avaliadas. Uma das possíveis causas dessa concentração de lignina seria a formação da pseudo-lignina. A pseudo-lignina forma-se em meios ácidos, a lignina é solubilizada, mas rapidamente é recondensada na superfície da biomassa lignocelulósica, gerando uma massa maior que a original (Hu et al., 2012; Pu et al., 2013; Cybulska et al., 2014).

A estrutura morfológica do BCA *in natura* e dos BCA tratados hidrotermicamente foram analisadas por MEV, como mostra a Figura 24. A análise das imagens revelou que o pré-tratamento hidrotérmico provocou uma modificação estrutural na biomassa tratada. O BCA *in natura*, Fig. 24(a), apresentou uma estrutura morfológica mais compacta, linear e organizada, com várias camadas planas de fibras do BCA sobrepostas umas sobre as outras. Observou-se que com o aumento do fator de severidade do BCA tratado também aumentou-se a desorganização da biomassa lignocelulósica. A Fig. 24(b) apresenta as fibras mais desestruturadas em relação ao BCA *in natura*. Na condição 195 °C/10 min as fibras do BCA ficaram mais expostas como mostra a Fig. 24(c), tornando-se mais acessíveis para a hidrólise enzimática. No pré-tratamento a 195 °C/60 min, Fig. 24(d) ocorreu uma severa desorganização das fibras do BCA, apresentando uma grande quantidade de poros interfibrilar no material. Rocha et al. em 2011, utilizando BCA pré-tratado com ácido, relatou que os poros observados no material tratado foram devidos a alta solubilização da hemicelulose e a total remoção dos extrativos. Efeito igualmente observado nessa condição avaliada (195 °C/60 min).

Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura do BCA *in natura* (a), 170°C/15 min (b), 195°C/10 min (c) e 195°C/60 min (d).



Com base nos resultados apresentados nesse conjunto de experimentos: recuperação de sólidos de 63,4%, rendimento em celulose de 55,7% e baixa formação de produtos de degradação optou-se em utilizar a condição de pré-tratamento hidrotérmico de 195 °C/10 min nos experimentos de deslignificação.

4.3 Pré-tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação alcalina: caracterização química e morfológica

Analisando os resultados obtidos nos pré-tratamentos hidrotérmicos observou-se que nas condições avaliadas não houve remoção significativa de lignina sendo, portanto, sugerida a deslignificação do material para facilitar as etapas de hidrólise enzimática e fermentação. Na deslignificação com soda promove-se a remoção da lignina e hemicelulose, melhorando a acessibilidade das enzimas ao polissacarídeo (Hendriks et al., 2009). Na Tabela 7 apresenta-se os dados da recuperação de sólidos do BCA.

Analisando os dados observou-se que o aumento na concentração de NaOH provoca uma maior perda de material. A perda de massa nas deslignificações em relação ao hidrotérmico 195 °C/10 min foram cerca de 8,7 % para o BCA deslignificado com 0,02% NaOH e 15,6% para o BCA tratado com solução de 0,5% NaOH.

Tabela 7. Recuperação de sólidos dos BCAs a 195 °C/10 min sem e com deslignificação.

Pré-tratamentos	Recuperação de sólidos (%)
195 °C/10 min	63,4
195 °C/10 min com 0,02% de NaOH	57,9
195 °C/10 min com 0,5% de NaOH	53,5

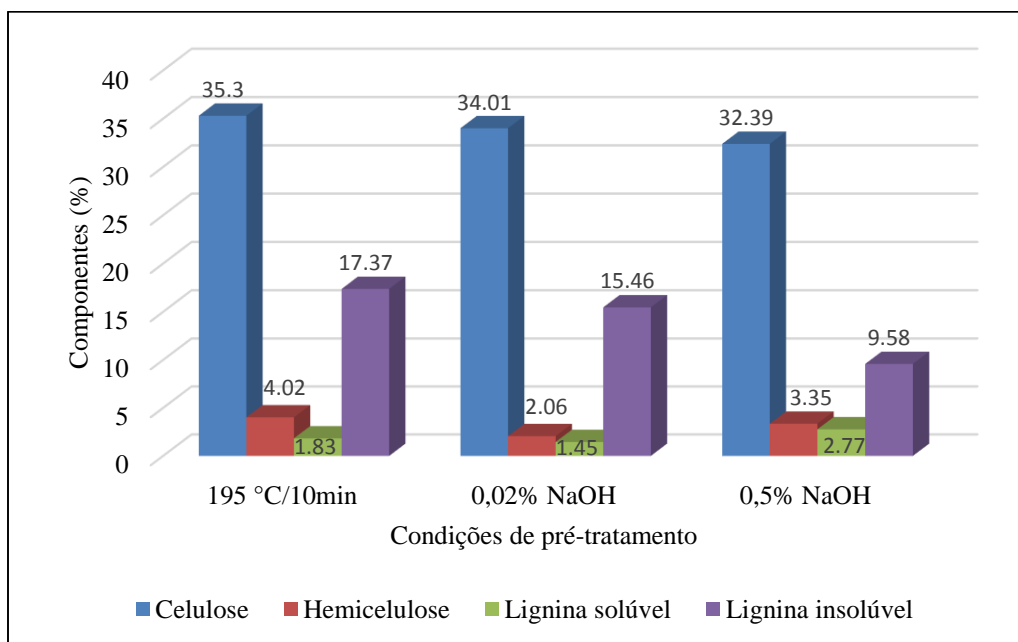
Os BCAs tratados hidrotérmicamente seguido de deslignificação a 0,02 e 0,5% de solução de NaOH foram caracterizados quimicamente e morfológicamente. A Tabela 8 apresenta a caracterização química dos seus principais componentes (celulose, hemicelulose, lignina e cinzas). A Figura 25 mostra os dados dos componentes recuperados após o pré-tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação com solução de hidróxido de sódio.

Tabela 8. Caracterização química dos BCAs pré-tratados hidrotérmicamente seguido de deslignificação com 0,02 e 0,5% de solução de NaOH.

Componentes (%)	<i>in natura</i>	195 °C/10 min	195 °C/10 min com 0,02% NaOH	195 °C/10 min com 0,5% NaOH
Celulose	40,8 ± 1,6	55,7 ± 0,8	58,7 ± 2,2	60,5 ± 0,5
Hemicelulose	24,5 ± 0,8	6,3 ± 0,1	3,6 ± 0,5	6,3 ± 0,8
Lignina solúvel	5,5 ± 1,3	2,9 ± 0,1	2,5 ± 0,2	5,2 ± 0,7
Lignina insolúvel	17,7 ± 1,5	27,4 ± 2,2	26,7 ± 0,5	17,9 ± 0,2
Cinzas	5,4 ± 1,1	4,3 ± 0,1	4,4 ± 0,1	5,1 ± 0,2
Extrativos	5,7 ± 0,4	-	-	-
Total	99,6	96,6	95,9	96,6

A recuperação de sólidos dos pré-tratados hidrotérmicamente seguido de deslignificação foram 63,4, 57,9 e 53,5% para 195 °C/10 min (sem deslignificação), 195 °C/10 min com 0,02% de NaOH e 195 °C/10 min com 0,5% de NaOH, respectivamente.

Figura 25. Quantidade percentual dos componentes recuperados após os pré-tratamentos do BCA.



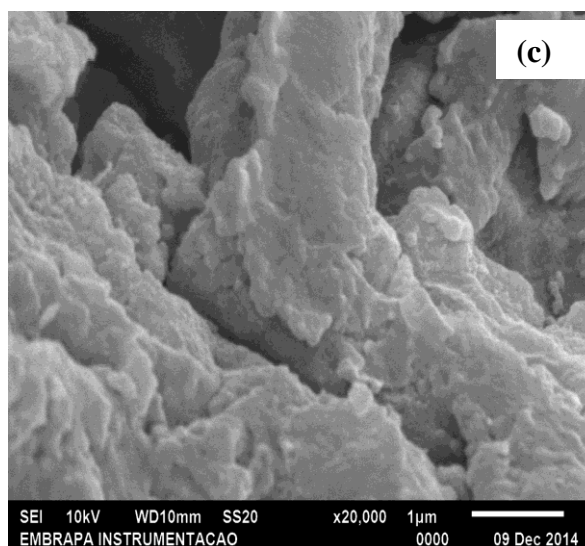
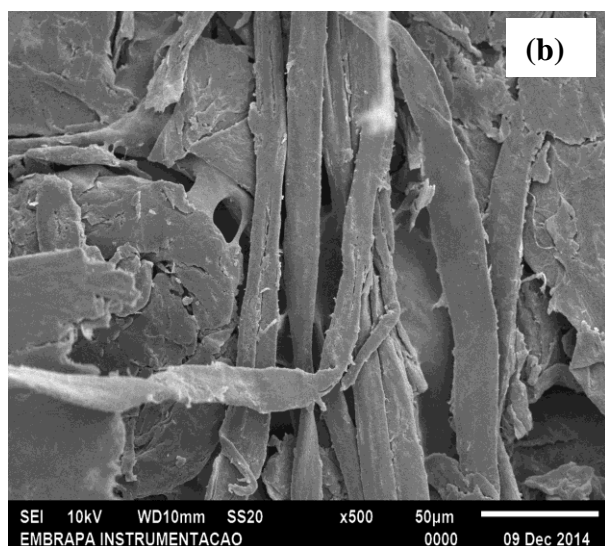
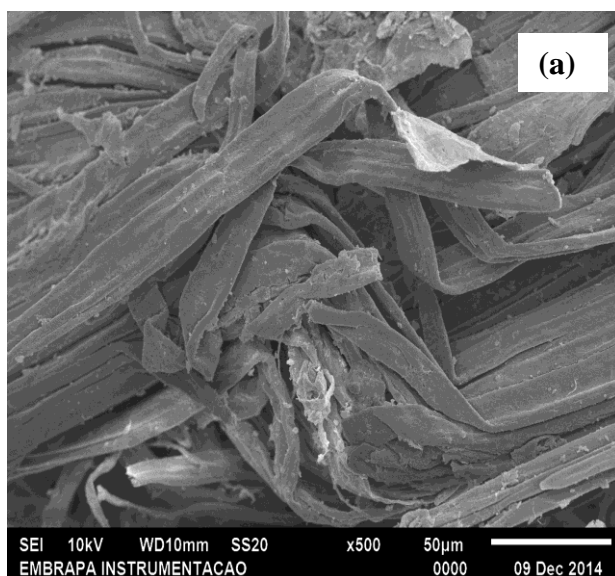
A análise dos dados apresentados mostrou que com o aumento da concentração de NaOH ocorreu um aumento no teor de celulose do BCA, 58,7 e 60,5% para BCA com 0,02% de NaOH e BCA com 0,5% de NaOH, respectivamente (Tabela 8). No entanto, como apresentado na Tabela 7 o aumento na concentração de NaOH promove uma menor recuperação de sólidos, ou seja, uma maior perda de biomassa lignocelulósica.

Analisando os resultados (Fig. 25) observou-se que a remoção de hemicelulose foi alta para os deslignificados sendo 91,4 e 86,1% para as condições com 0,02 e 0,5% de solução de NaOH, respectivamente. O teor de lignina insolúvel foi reduzido quase pela metade (45,8 %) para o BCA com 0,5% NaOH. Oliveira et al. 2014 utilizando palha de cana-de-açúcar obteve cerca de 65% de deslignificação na condição de 190 °C/10 min (hidrotérmico) seguido de deslignificação com 1% de NaOH. O hidróxido de sódio causa o inchamento da biomassa, diminuindo o grau de polimerização e cristalinidade o que provoca a ruptura da estrutura da lignina (Taherzadeh e Karimi 2008; Hendriks et al., 2009).

A perda de celulose foi de 16,7 e 20,7% para BCA utilizando 0,02 e 0,5% de NaOH, respectivamente, em comparação com o BCA tratado hidrotérmicamente a 195 °C/10 min. Em baixas concentrações de soda a degradação da celulose não é tão intensa, porém a extração com álcali pode causar uma modificação no estado cristalino da celulose, reduzindo ou neutralizando o efeito de inchaço da celulose (Hendriks et al., 2009).

As mudanças físicas ocorridas durante o pré-tratamento hidrotérmico seguido de deslignificação foram investigadas por análise de MEV. A Figura 26(a) apresenta a morfologia do BCA pré-tratado e deslignificado com 0,02% de NaOH. Observou-se que a deslignificação causou uma maior desorganização e separação das fibras, com regiões em que as fibras já não encontram-se paralelas (estão retorcidas) e apresentam alguns fragmentos na superfície. Para a condição utilizando 0,5% de NaOH, Fig. 26(b), observou-se regiões com separação das fibras e outras regiões que foram condensadas (derretidas) e posteriormente, recondensadas. A magnificação de 20,000x do mesmo material em uma outra região, Fig. 26(c), confirma esse efeito, apresentando uma região em que ocorreu depósito na fibra que sugere a formação da pseudo-lignina. Reporta-se que o impacto da pseudo-lignina na hidrólise enzimática reflete em uma menor produção de açúcares e seu efeito inibidor foi mostrado ser maior que o da lignina (Hu et al., 2012).

Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura do BCA 0,02% NaOH (a), 0,5% NaOH (b) e 0,5% NaOH magnificação de 20,000x (c).

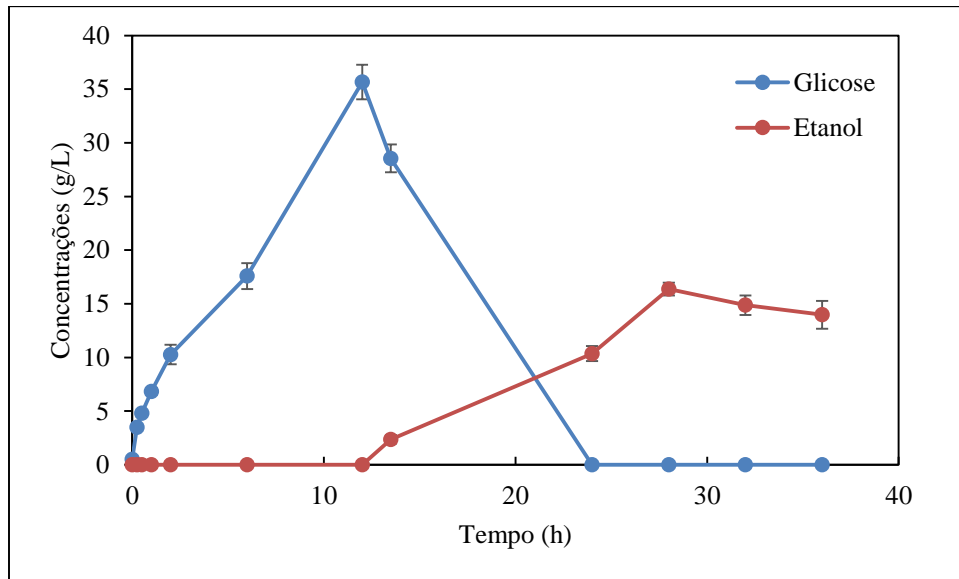


4.4 Hidrólise enzimática e fermentação do BCA

4.4.1 PSSF do BCA pré-tratado a 195 °C/10 min

Os experimentos na configuração PSSF foram realizados em reatores encamisados com agitação de 300 rpm, 10% de carga de BCA seco e 20 FPU/g BCA tratado. A pré-sacarificação do BCA tratado a 195 °C/10 min foi realizada por 12 h a 50 °C e, em seguida, o BCA foi hidrolisado e fermentado por 24 h a 35 °C utilizando a levedura *S. cerevisiae* SA-1, como mostra a Figura 27.

Figura 27. Concentração de glicose e etanol para o BCA a 195 °C/10 min em PSSF.



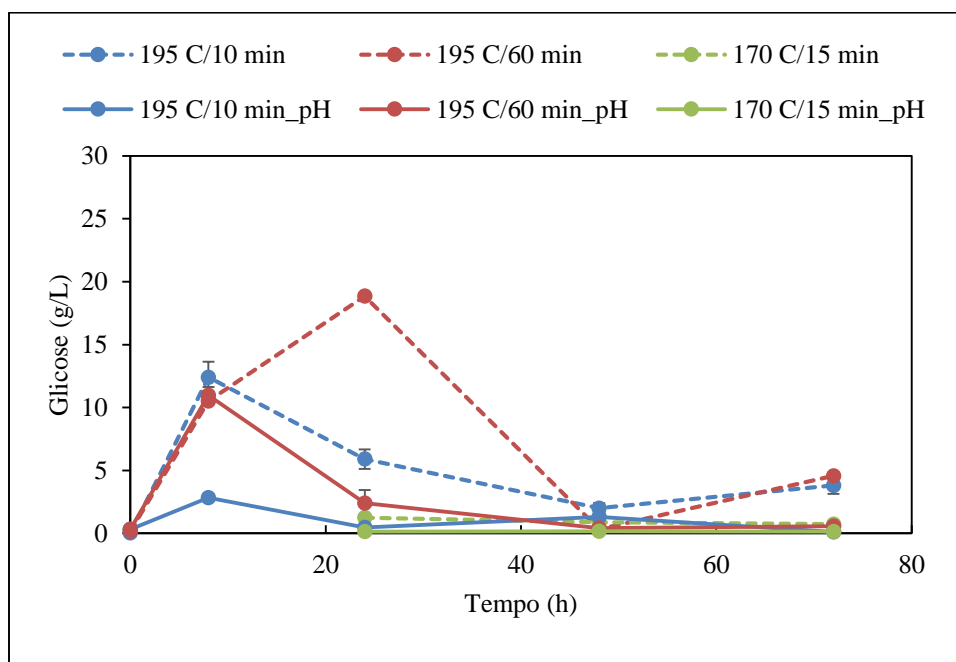
Analisando os resultados obtidos a concentração máxima de etanol foi de 16,4 g/L em 28 h de PSSF. A conversão em glicose foi de 57,8%, apresentando 35,7 g/L de concentração de glicose no tempo de 12 h. Durante os experimentos, a concentração de ácido acético foi < 0,2 g/L. Em 2011, García-Aparicio et al. relataram que utilizando a palha de cevada pré-tratada com explosão a vapor obteve-se em processo PSSF (*shaker*) 16,1 g/L de etanol em 72 h com 10% de sólidos, sendo que a pré-sacarificação foi de 24 h. Os autores obtiveram em processo SSF (*shaker*) uma concentração de etanol de 19,4 g/L em 72 h. Outros autores utilizando o BCA pré-tratado com explosão a vapor obtiveram 60,2% de rendimento em etanol com 16% de sólidos, sendo a pré-sacarificação de 24 h (Amores et al., 2013). Portanto, os resultados obtidos nos experimentos

de PSSF foram satisfatórios em relação aos da literatura e tendo em vista o melhoramento de todo o processo de obtenção de etanol optou-se em utilizar o processo em SSF com rotação orbital (*shaker*).

4.4.2 SSF dos BCAs pré-tratados hidrotérmicamente

Realizou-se experimentos de SSF com todas as condições avaliadas de pré-tratamento hidrotérmico (170 °C/15 min, 195 °C/10 min e 195 °C/60 min). Os ensaios foram conduzidos em *shaker* com agitação de 250 rpm a 37 °C por 72 h. A carga enzimática utilizada foi de 20 FPU/g BCA tratado, carga de sólidos de 10% e a levedura foi a *S. cerevisiae* comercial. Nesses ensaios avaliou-se a influência do pH no processo de hidrólise e fermentação. As Figura 28 e 29 apresentam os gráficos das concentrações de glicose e etanol, respectivamente.

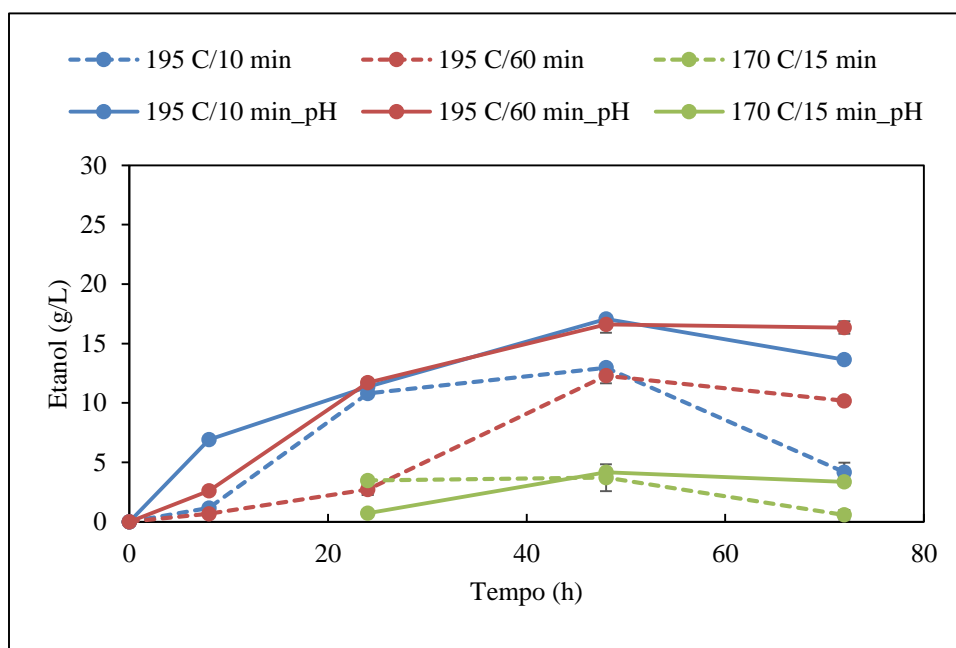
Figura 28. Concentrações de glicose dos experimentos de SSF. As linhas tracejadas representam ensaios com meio não tamponado e as linhas contínuas experimentos com meio tamponado.



Analisando os resultados obtidos observou-se que a concentração de glicose (Fig. 28) aumentou para todos os experimentos durante as primeiras 8 h indicando a hidrólise da celulose a glicose e uma rápida produção de etanol (Fig. 29), exceto para a condição 170 °C/15 min que teve

a sua dissolução inicial em 24 h. Após 24 h, a produção de etanol foi maior que a hidrólise enzimática, resultando em uma diminuição da concentração de glicose. Em 48 h, a concentração de glicose foi $< 1,0$ g/L para todos os ensaios com meio tamponado, porém para os experimentos sem o meio tamponado ocorreu um acúmulo de glicose após 48 h, sendo aproximadamente 4,0 e 4,5 g/L para as condições 195 °C/10 min e 195 °C/60 min, respectivamente. Para a condição 170 °C/15 min a hidrólise não foi efetiva, provavelmente, devido às condições operacionais de pré-tratamento que não foram satisfatórias, pois como apresentado no item 4.2 em sua caracterização química obteve-se uma leve remoção de hemicelulose e o teor de lignina não foi alterado.

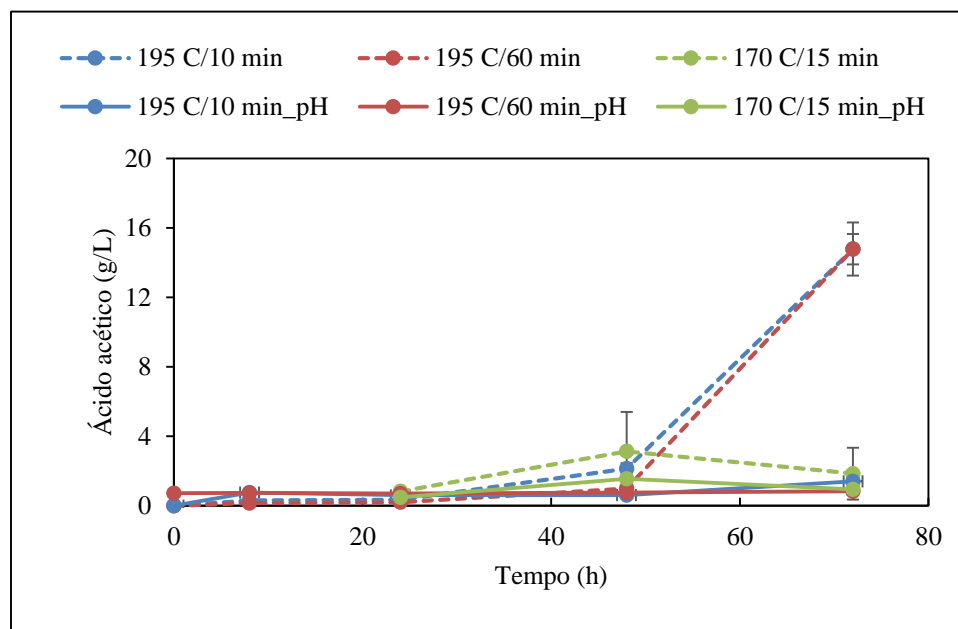
Figura 29. Concentrações de etanol dos experimentos de SSF. As linhas tracejadas representam ensaios com meio não tamponado e as linhas contínuas experimentos com meio tamponado.



A máxima concentração de etanol foi alcançada em 48 h em todas as condições avaliadas, a Tabela 9 apresenta os resultados obtidos nesses ensaios. Nos experimentos com o meio tamponado obteve-se um maior rendimento em etanol sendo 53,8 e 55,7% para as condições 195 °C/10 min e 195 °C/60 min, respectivamente. Nos experimentos sem o meio tamponado os rendimentos em etanol foram de 41,0% apresentando um acúmulo de ácido acético no meio reacional (Fig. 30) que alcançou o valor em média de 15,0 g/L para ambas as condições de

195 °C/10 min e 195 °C/60 min, respectivamente. Ruiz et al. em 2012, reportaram que utilizando a palha de trigo pré-tratada hidrotermicamente e com carga enzimática de 30 FPU/g celulose (3% de celulose efetiva) obtiveram 10,8 g/L de etanol em 48 h, resultando em um rendimento em etanol de 55,7% em processo SSF a 37 °C e pH 4,8. O comportamento da produção de ácido acético é apresentado na Figura 30.

Figura 30. Concentração de ácido acético nos ensaios de SSFs. As linhas tracejadas representam ensaios com meio não tamponado e as linhas contínuas experimentos com meio tamponado.



A concentração final de ácido acético para os ensaios sem o meio tamponado foram altas cerca de 15,0 g/L para as condições 195 °C/10 min e 195 °C/60 min, respectivamente. A formação de ácido acético durante a fermentação do açúcar pode inibir o crescimento da levedura (Pessani et al., 2011). Narendranath et al. em 2001, reportaram que a levedura *S. cerevisiae* não foi capaz de crescer em meio com 6 g/L de ácido acético. Como o meio reacional não estava tamponado nessas condições pode ter favorecido o aumento da concentração de ácido acético e pode ter prejudicado a fermentação do açúcar pela levedura. Nas condições tamponadas as concentrações foram < 1,4 g/L de ácido acético.

As concentrações máximas de etanol foram para as condições tamponadas (pH 4,8) sendo 17,1 e 16,7 g/L de etanol em 48 h de processo SSF em 195 °C/10 min e 195 °C/60 min, respectivamente. Cybulska et al. em 2014, obtiveram 17,2 g/L de etanol em 72 h utilizando 10%

de *Salicornia bigelovii* em processo SSF com pH 4,8. Os autores também relataram rendimento em etanol de 77,0% utilizando a levedura *S. cerevisiae*. Sendo assim, a condição de SSF em meio tamponado com pré-tratado 195 °C/10 min obteve satisfatória concentração de etanol (17,1 g/L) em 48 h de processo em relação aos dados obtidos na literatura.

Tabela 9. Dados com meio tamponado sinal (+) e meio não tamponado sinal (-) em 48 h.

Condições de pré-tratamentos	pH 4,8	C _{glicose} (%)	Etanol (g/L)	Y _{E/ET} (%)	pH _{final} SSF
170 °C/15 min	-	16,0	3,7	13,5	4,2
	+	16,6	4,2	16,2	5,4
195 °C/10 min	-	44,2	13,0	41,0	3,1
	+	55,9	17,1	53,8	3,7
195 °C/60 min	-	41,5	12,3	41,0	3,2
	+	56,4	16,7	55,7	4,1

C_{glicose}: conversão da celulose em glicose (%);

Y_{E/ET}: rendimento em etanol do processo de SSF, etanol obtido na SSF sob etanol teórico (%);

pH_{final} SSF: pH final do processo de SSF em 72 h.

Nos presentes ensaios, após 48 h de SSF as concentrações de etanol diminuíram para todas as condições avaliadas, provavelmente, pelo metabolismo da levedura que consumiu o etanol produzido. As exceções foram nas condições que apresentaram altos valores de ácido acético (195 °C/10 min e 195 °C/60 min, meio não tamponado), acarretando em um acúmulo de glicose em 72 h (Fig. 27). Estudos comprovam que o estresse da levedura pode levar a uma maior produção de ácido acético (Faga et al., 2010; Pessani et al., 2011).

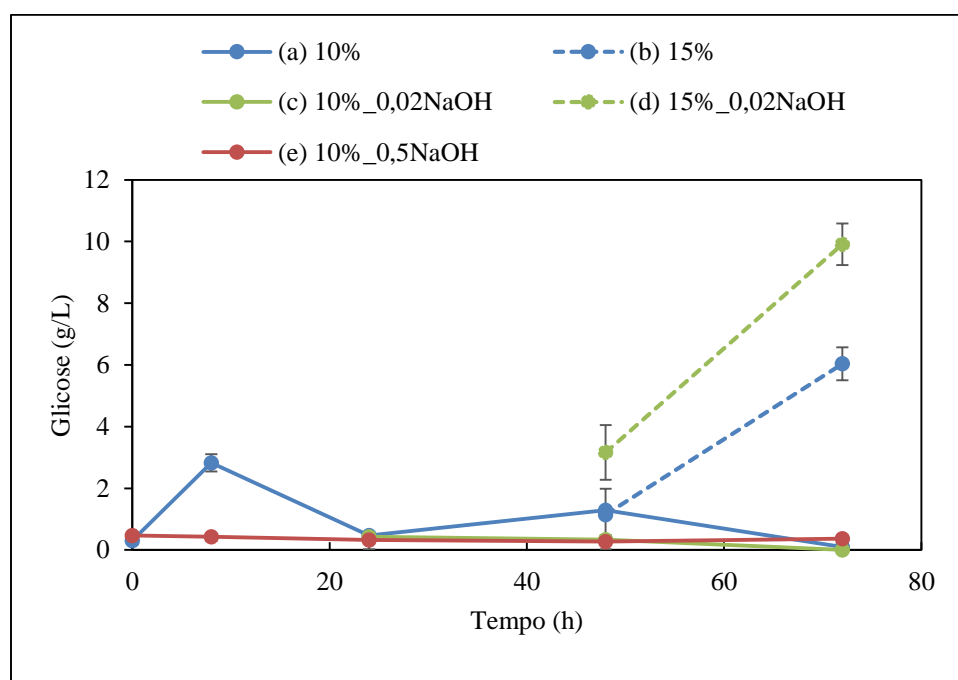
Os pHs finais produzidos nas SSFs (Tab. 9), mostram resultados de pHs mais ácidos quando o meio inicial do processo não foi tamponado, em média pH 3,0 (195 °C/10 min e 195 °C/60 min) favorecendo o efeito de estresse da levedura. Outros autores relatam que a concentração de ácido acético variando entre 0,5 a 9,0 g/L pode inibir o crescimento da levedura. Os mesmos autores atribuem esse efeito de inibição da levedura pela ruptura da sua membrana em meios mais ácidos (Maiorela et al., 1983). Com base em todos os resultados apresentados (Tab. 9) observou-se que o meio reacional tamponado favoreceu a uma maior concentração de etanol,

diminuindo a produção de ácido acético. A melhor condição obtida foi com o BCA pré-tratado a 195 °C/10 min alcançando rendimento em etanol de 53,8% em 48 h.

4.4.3 SSF dos BCAs pré-tratados hidrotermicamente seguido de deslignificação alcalina

Ensaio de SSF foram realizados com os BCAs pré-tratados hidrotermicamente e seguidos de deslignificação, em diferentes cargas de sólidos. Os experimentos foram realizados em *shaker* com rotação de 250 rpm a 37 °C por 72 h. A carga enzimática utilizada foi de 20 FPU/g BCA tratado e a levedura foi a *S. cerevisiae* comercial. O conjunto de experimentos foi realizado nas seguintes condições: (a) 10% BCA/20 FPU/g BCA tratado, (b) 15% BCA/20 FPU/g BCA tratado, (c) 10% BCA + 0,02% NaOH/20 FPU/g BCA tratado, (d) 15% BCA + 0,02% NaOH/20 FPU/g BCA tratado e (e) 10% BCA + 0,5% NaOH/20 FPU/g BCA tratado. Nas condições com 15% de BCA adicionou-se microesferas metálicas para auxiliar na dissolução do material. A Figura 31 apresenta a concentração de glicose ao longo dos experimentos de SSF.

Figura 31. Concentração de glicose dos experimentos de SSF realizados com BCAs tratado hidrotermicamente e deslignificados com 0,02 e 0,5% de NaOH. Linhas contínuas representam 10% de sólidos e linhas tracejadas 15% de sólidos.



Analisando os dados obtidos notou-se que no início da hidrólise (8 h) a condição (a) com de 10% BCA apresentou uma maior hidrólise da celulose a glicose (Fig. 31) e uma rápida fermentação a etanol (Fig. 32). As condições (c) e (e) obtiveram ao longo do tempo de SSF baixas concentrações de glicose, pois a glicose rapidamente foi consumida pela levedura gerando o etanol (Fig. 32). As condições (b) e (d) obtiveram a dissolução do BCA tratado no tempo de 48 h, sendo o hidrolisado rapidamente convertido a etanol (Fig. 32). De acordo com a Tabela 10, conforme aumentou a deslignificação ocorreu uma diminuição na conversão enzimática em relação ao BCA não deslignificado, provavelmente, devido a deformação da lignina que pode ter prejudicado o acesso das celulases a celulose nas condições (c) e (e). Oliveira et al. em 2014 observou o mesmo comportamento na deslignificação da palha de cana-de-açúcar, a digestibilidade enzimática da palha não foi melhorada com a deslignificação. Durante o pré-tratamento a lignina pode redistribuir-se e migrar para a superfície da biomassa lignocelulósica, aumentando a sua massa no substrato, dificultando o acesso das celulases à celulose levando a uma diminuição do rendimento da hidrólise enzimática (Donohoe et al., 2008; Trajano et al., 2013). Outros estudos também relataram o impacto da pseudo-lignina na hidrólise da celulose e observaram uma menor liberação de açúcar com o aumento do teor da pseudo-lignina, e esse efeito de inibição mostrou ser mais significativo que o da lignina (Hu et al., 2012).

O efeito da carga de sólidos mostrou que com 15% de sólidos, condição (b), a conversão enzimática foi de 66,4% de glicose em 72 h (Tabela 10). E utilizando BCA deslignificado condição (d) observou-se o mesmo efeito uma maior conversão enzimática para 15% de sólidos. Comparando BCAs deslignificados com não deslignificado observou-se que as condições sem deslignificação apresentaram maiores rendimentos em etanol.

O aumento na carga de sólidos requereu a adição de microesferas metálicas para auxiliar na dissolução do BCA, sendo essa alcançada em 48 h de SSF. No entanto, como mostrado na Tabela 10 obteve-se uma maior conversão em glicose com 15% de sólidos quando comparado com BCAs empregando 10% de sólidos em todas as condições avaliadas.

A condição (a) 195 °C/10 min alcançou 55,9% de conversão em glicose em 48 h, sendo 50,3% em celulose apresentando, portanto, um resultado satisfatório sem adição de microesferas metálicas para auxiliar na dissolução do BCA. Estudos anteriores relatam 53,0% de conversão de celulose da palha de cana-de-açúcar na condição de pré-tratamento de 195 °C/10 min utilizando 10% de sólidos por 72 h (Oliveira et al., 2014).

Na literatura tem sido reportado trabalhos que apresentaram problemas na agitação do material a ser hidrolisado e fermentado quando utilizaram altas cargas de sólidos (Mohagheghi et al., 1992; Hoyer et al., 2013). Amores et al. em 2013, superou o problema de agitação do BCA pré-tratado com a explosão a vapor utilizando o processo SSF de duas maneiras: (1) realizando uma pré-sacarificação de 24 h e (2) suplementando os experimentos com xilanase. Os autores obtiveram com 20% de sólidos em 72 h de processo 64,3% de rendimento em etanol.

Outros autores superaram o problema de agitação do substrato utilizando processo SSF em batelada alimentada (Koppram e Olsson, 2014). Os benefícios do uso da batelada alimentada incluem: facilidade na agitação devido a parcial sacarificação, resultando na capacidade de adicionar mais substrato pouco a pouco no procedimento, baixo consumo de energia devido a baixa viscosidade em relação ao processo em batelada, baixa concentração de compostos inibidores facilitando a fermentação pelas leveduras e baixa concentração de glicose no meio reacional facilitando a fermentação de xilose na utilização de leveduras recombinantes (Öhgren et al., 2006; Olofsson et al., 2008).

Figura 32. Concentração de etanol dos experimentos de SSF realizados com BCAs tratado hidrotermicamente e deslignificados com 0,02 e 0,5% de NaOH. Linhas contínuas representam 10% de sólidos e linhas tracejadas 15% de sólidos.

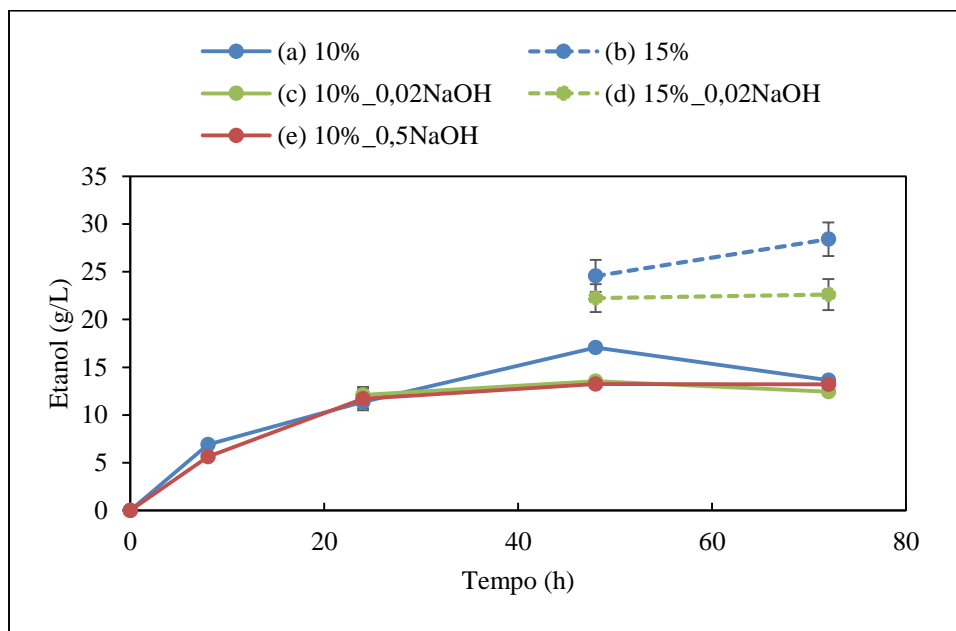


Tabela 10. Dados obtidos durante a SSF em 48 h.

Condições de pré-tratamentos	Carga de sólidos (%)	C _{glicose} (%)	Etanol (g/L)	Y _{E/ET} (%)	Q _E (g/L.h)
195 °C/10 min	10	55,9	17,1	53,8	0,36
	15	66,4 ^a	28,4 ^a	60,0 ^a	0,39 ^a
195 °C/10 min 0,02% NaOH	10	41,1	13,5	40,6	0,28
	15	55,3 ^a	22,6 ^a	45,2 ^a	0,31 ^a
195 °C/10 min 0,5% NaOH	10	38,9	13,2	38,4	0,28

C_{glicose}: conversão da celulose em glicose (%);

Y_{E/ET}: rendimento em etanol do processo de SSF, etanol obtido na SSF sob etanol teórico (%);

Q_E: produtividade volumétrica de etanol em 48 h de SSF;

^(a): em 72 h.

A concentração máxima de etanol foi de 28,4 g/L (Fig. 32) condição (b), apresentando um rendimento de 60,0% de etanol e o maior valor de produtividade volumétrica de etanol (Q_E) 0,39 g/L.h em 72 h (Tab. 10). Seguido pela condição (a) alcançando concentração de etanol de 17,1 g/L e Q_E 0,36 g/L.h em 48 h. Moreno et al. (2013) obtiveram com a palha de trigo pré-tratada com explosão de vapor Q_E de 0,39 g/L.h em 24 h de processo de SSF. Outros autores relataram concentração de etanol de 20,5 g/L e Q_E de 0,39 g/L.h em processo de SSF utilizando sabugo de milho (Öhgren et al., 2007).

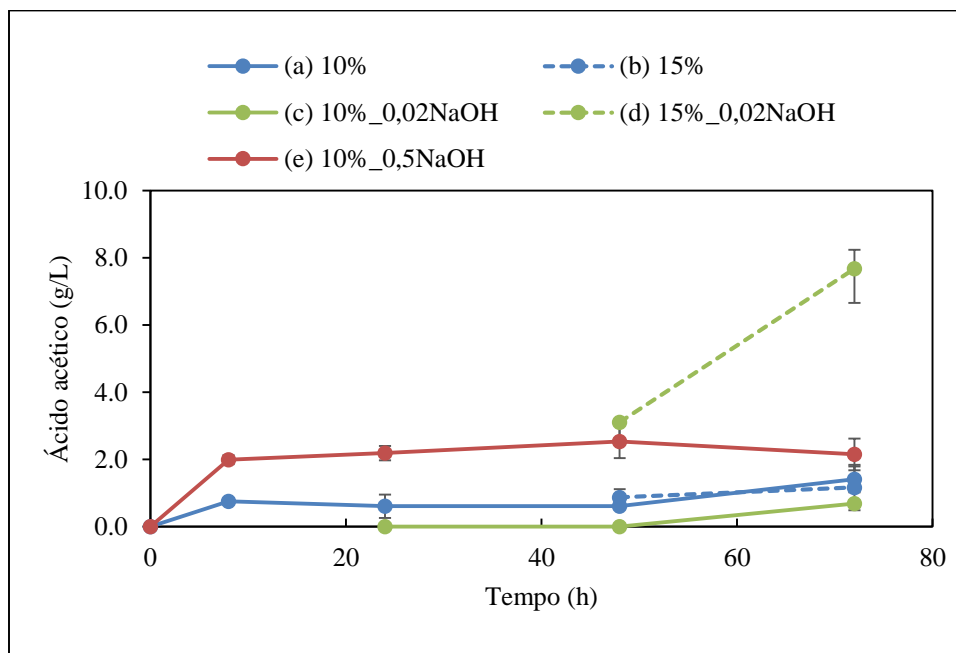
Analisando os resultados (Tab. 10) observou-se que com o aumento no teor de sólidos aumentou-se a concentração de etanol final. Na produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, a concentração de etanol deve ser a mais elevada possível, para minimizar o consumo de energia na evaporação e destilação (Wingren et al., 2003). Porém, altas cargas de sólidos acarretam em dificuldades de solubilização da biomassa lignocelulósica, como apresentado nesse trabalho, havendo a necessidade de adicionar microesferas metálicas para ajudar na agitação do BCA a ser hidrolisado. Na deslignificação do BCA notou-se o mesmo comportamento no aumento da carga de sólidos.

As condições (c) e (e) apresentaram o mesmo valor de Q_E 0,28 g/L.h e concentrações de etanol de 13,5 e 13,2 g/L em 48 h, respectivamente (Tab. 10). Estudo anterior reportou que o BCA

pré-tratado com explosão a vapor seguido por deslignificação com 1% NaOH alcançou cerca de 25,0 g/L de concentração de etanol utilizando processo SSF, porém vale ressaltar que o BCA apresentava 81,8% de teor de celulose (Santos et al., 2012). No presente estudo obteve-se 58,7 e 60,5% de celulose para as condições (c) e (e), respectivamente.

Os perfis de ácido acético durante as SSFs são apresentados na Figura 33. Na análise do gráfico observou-se uma alta concentração de ácido acético obtida na condição (d) cerca de 8,0 g/L no final do processo de SSF. Notou-se que para essa condição (d) a concentração de etanol em 48 e 72 h foram similares cerca de 22,2 e 22,6 g/L, respectivamente. Portanto, o grande aumento na concentração de ácido acético foi devido ao desvio de rota da levedura, ou seja, a levedura começou a metabolizar o etanol gerando o ácido acético no meio de fermentação.

Figura 33. Concentração de ácido acético dos experimentos de SSF. Linhas contínuas representam 10% de sólidos e linhas tracejadas 15% de sólidos.



Em 48 h, a condição (e) apresentou 2,5 g/L de ácido acético e ao final do processo de SSF em 72 h houve uma leve queda na concentração de ácido acético cerca de 2,0 g/L. De acordo com a Fig. 32, as concentrações de etanol foram similares entre 48 a 72 h, portanto, essa leve queda deve estar relacionada com a margem de erro (0,50 a 0,47, respectivamente). No final da SSF (72 h) as condições (a) e (c) apresentaram um pequeno aumento na concentração de ácido acético

que está relacionado com a diminuição da produção de etanol. Para a condição (b), a concentração de ácido acético não foi alterada de 48 a 72 h de processo SSF.

Com base nos dados apresentados observou-se que o aumento na carga de sólidos aumenta a concentração de etanol, porém a sua solubilização é prejudicada, sendo em 48 h o início de sua dissolução. A condição avaliada (a) 10% de BCA foi a que apresentou um satisfatório rendimento em etanol 53,8% (48 h) e baixa concentração de ácido acético < 1,5 g/L durante o processo de SSF. A deslignificação do BCA não foi necessária para a obtenção de rendimentos satisfatórios em etanol, vale ressaltar que foram nas condições avaliadas no presente estudo.

4.4.4 SHF dos BCAs pré-tratados hidrotermicamente seguido de deslignificação alcalina

O processo de obtenção de açúcares a partir da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol 2G pode ser obtido separadamente, esse processo é denominado de SHF. No processo SHF a temperatura da hidrólise enzimática pode ser otimizada independente da temperatura de fermentação. Nesse projeto a enzima utilizada foi a Accellerase 1500, portanto, propôs-se realizar experimentos de SHF para trabalhar na temperatura ótima da enzima visando a obtenção de maiores quantidades de açúcares no hidrolisado para posterior fermentação.

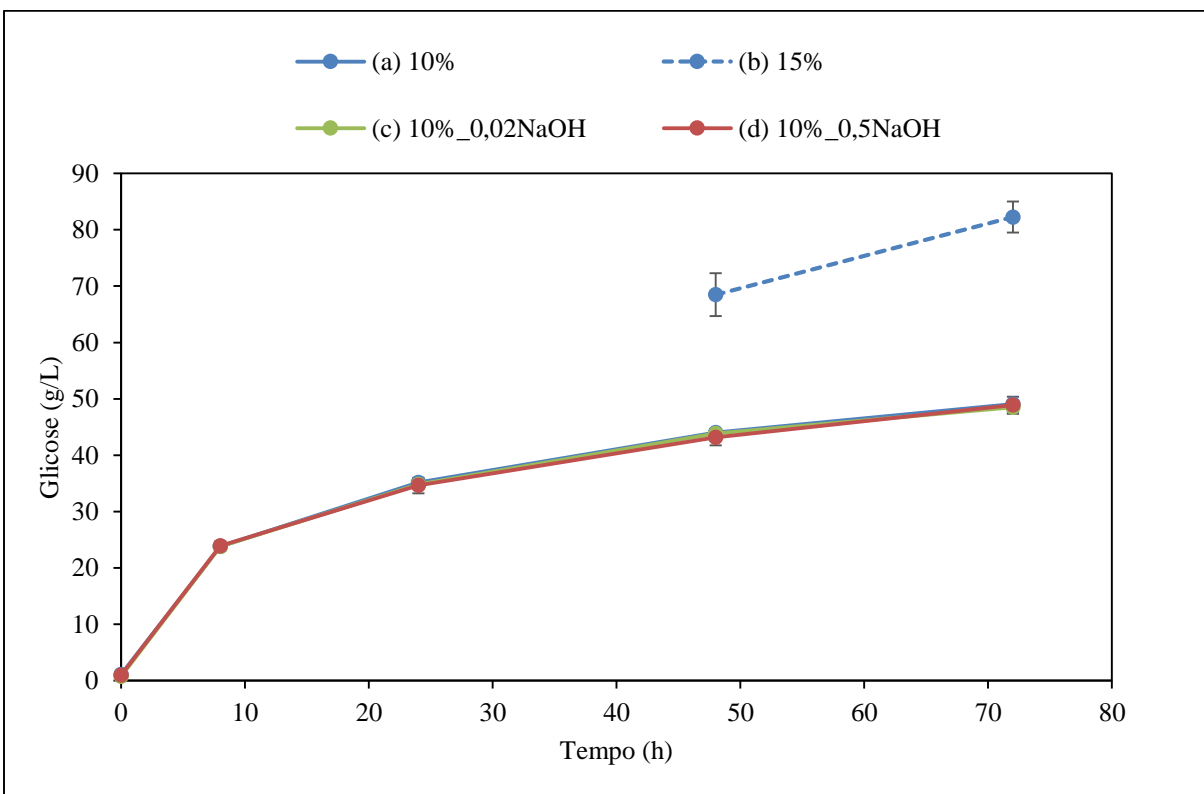
Os experimentos de SHF foram realizados com os BCAs pré-tratados hidrotermicamente e seguidos de deslignificação. As hidrólises enzimáticas foram realizadas em *shaker* com rotação de 250 rpm a 50 °C por 72 h utilizando carga de sólidos de 20 FPU/g BCA tratado. As fermentações foram realizadas a 32 °C por 3,5 h utilizando a levedura *S. cerevisiae* comercial. As condições experimentais foram: (a) 10% BCA/20 FPU/g BCA tratado, (b) 15% BCA/20 FPU/g BCA tratado, (c) 10% BCA + 0,02% NaOH/20 FPU/g BCA tratado e (d) 10% BCA + 0,5% NaOH/20 FPU/g BCA tratado. Na condição com 15% de BCA adicionou-se microesferas metálicas para auxiliar na dissolução da biomassa lignocelulósica. A Figura 34 apresenta o perfil da hidrólise enzimática ao longo do tempo.

A hidrólise enzimática das condições (a), (c) e (d) apresentaram o mesmo comportamento durante as 72 h (Figura 34). Nas primeiras 8 h obteve-se uma rápida hidrólise enzimática e as condições (a), (c) e (d) obtiveram em média 24,0 g/L em glicose. No tempo de 48 h as concentrações em glicose foram em média 44,0 g/L alcançando máxima concentração de glicose

em média de 49,9 g/L em 72 h. Para a condição (b) o início da hidrólise enzimática ocorreu em 48 h (68,5 g/L), notou-se que mesmo a enzima atuando na sua temperatura ótima a dissolução do BCA na hidrólise enzimática ocorreu no mesmo tempo que nos experimentos de SSF, porém com uma maior conversão enzimática 88,5% (Tabela 11).

A hidrólise enzimática da celulose consiste basicamente de três etapas: adsorção da enzima celulase na superfície da celulose, biodegradação da celulose em açúcares fermentescíveis e dessorção das celulases. A atividade da celulase diminui durante a hidrólise enzimática. A adsorção irreversível da celulase na celulose é parcialmente responsável por esta desativação (Converse et al., 1988). Sun e Cheng em 2002 relataram que a adição de surfactantes durante a hidrólise é capaz de modificar as propriedades da superfície da celulose e minimizar o efeito da ligação irreversível da celulase na celulose.

Figura 34. Concentração de glicose dos ensaios de SHF realizados com BCAs tratado hidrotérmicamente e deslignificados com 0,02 e 0,5% de NaOH.



A conversão máxima enzimática utilizando 10% de BCA foi para a condição (a) 195 °C/10 min obtendo 79,3% (49,1 g/L) em 72 h (Tabela 11). Para o BCA deslignificado a maior conversão enzimática foi de 74,2% (48,5 g/L) em 72 h para a condição (c) 195 °C/10 min com 0,02% de NaOH. Estudos anteriores relataram concentração máxima de glicose de 39,0 g/L em 48 h utilizando 8% de BCA pré-tratado com explosão a vapor e deslignificado com 1% NaOH (Wanderley et al., 2013).

Rocha et al. em 2011 obtiveram 76% de conversão enzimática em 72 h utilizando 10% de BCA pré-tratado com ácido diluído. Portanto, os resultados obtidos nas hidrólises enzimáticas foram superiores ao descrito por Rocha et al. (2011) utilizando o pré-tratamento hidrotérmico no BCA e comprovam também alta digestibilidade da celulose empregando a enzima Accellerase 1500 em sua temperatura ótima.

A concentração máxima de etanol para as condições (b), (c) e (d) foram obtidas em 2,5 h de fermentação como mostra a Figura 35(a). Para a condição (a) a máxima concentração de etanol foi de 25,4 g/L em 2 h. O máximo rendimento em etanol foi de 84,0% com 15% de sólidos. A Figura 35(b) apresenta o consumo de glicose durante a fermentação. Analisando os dados observou-se que em 0,5 h a concentração de glicose apresentou uma queda acentuada para as condições com 10% de BCA. Para a condição com 15% de BCA houve uma leve queda em 0,5 h de fermentação, apresentando um maior consumo de glicose pela levedura entre 1 a 2 h. Após 3 h de fermentação a concentração de glicose foi praticamente zero para todas as condições avaliadas.

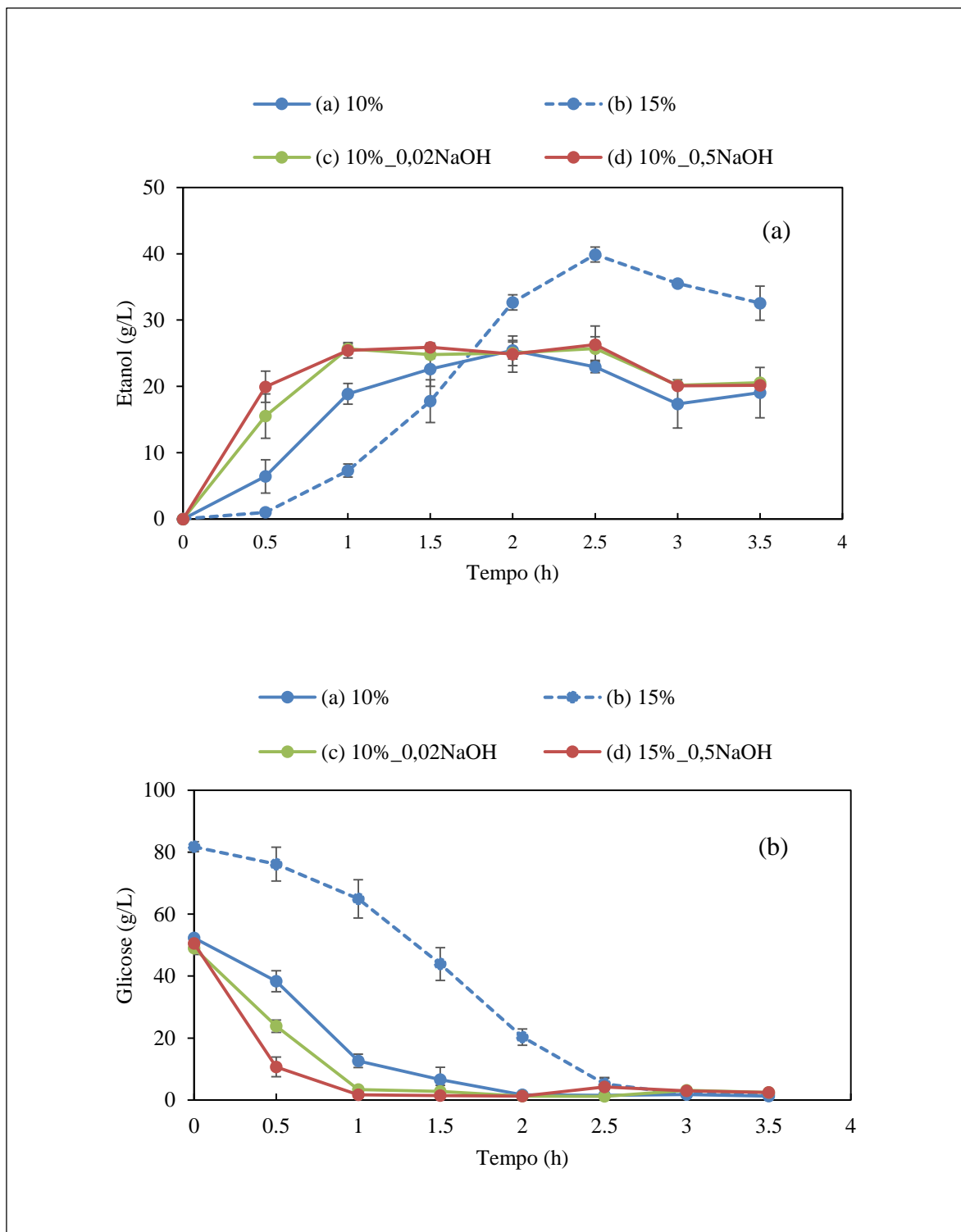
Tabela 11. Dados obtidos durante a SHF.

Condições de pré-tratamentos	Carga de sólidos (%)	C _{glicose} (%)	Etanol (g/L)	Y _{E/ET} (%)
195 °C/10 min	10	79,3	25,4	80,4
	15	88,5	39,9	84,0
195 °C/10 min 0,02% NaOH	10	74,2	25,7	77,0
195 °C/10 min 0,5% NaOH	10	72,7	26,3	76,4

C_{glicose}: conversão da celulose em glicose (%);

Y_{E/ET}: rendimento em etanol do processo de SSF, etanol obtido na SSF sob etanol teórico (%).

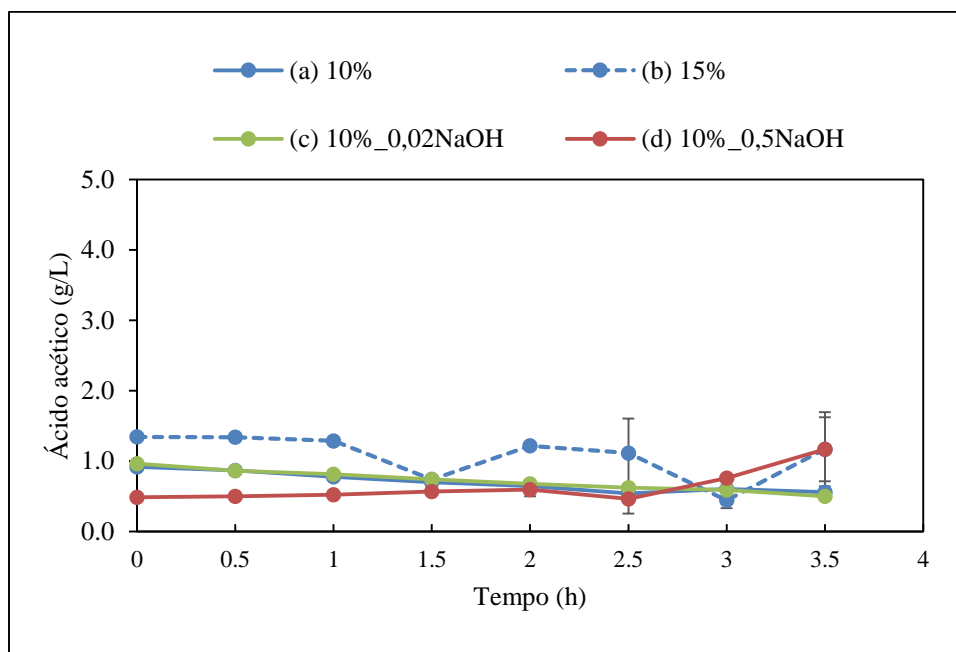
Figura 35. Concentração de etanol (a) e consumo da glicose (b) nos experimentos de SHF realizados com BCAs tratado hidrotérmicamente e deslignificados com 0,02 e 0,5% de NaOH.



Em 2015, Francó et al. reportaram satisfatórios resultados utilizando 10% de *spruce* pré-tratado com explosão a vapor como substrato para a produção de etanol em processo SHF. Os autores obtiveram concentração final de etanol de 36,1 g/L e rendimento em etanol de 75,1% utilizando *S. cerevisiae* industrial com carga enzimática de 20 FPU Cellic CTec3/g substrato. No presente trabalho obteve-se utilizando 10% de BCA pré-tratado hidrotermicamente rendimento em etanol de 80,4% utilizando *S. cerevisiae* comercial e 20 FPU Accellerase 1500/g substrato, ou seja, um rendimento em etanol superior foi obtido nesses experimentos. A Figura 36 apresenta o perfil da concentração de ácido acético.

Analisando os dados da Figura 36, observou-se que no início da fermentação já havia uma concentração de ácido acético entre 0,5 a 1,5 g/L no tempo zero para todas as condições avaliadas. Essa concentração de ácido acético é proveniente da hidrólise do grupo acetil da hemicelulose. Durante todo o processo de fermentação as concentrações de ácido acético foram < 1,5 g/L.

Figura 36. Concentração de ácido acético dos experimentos de SHF realizados com BCAs tratado hidrotermicamente e deslignificados com 0,02 e 0,5% de NaOH.



Os ácidos alifáticos tais como, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico estão presentes nos materiais lignocelulósicos. Esses ácidos têm efeitos tóxicos às leveduras, como *S. cerevisiae*. O efeito tóxico para *S. cerevisiae* é atribuído a forma não dissociada e aumenta na

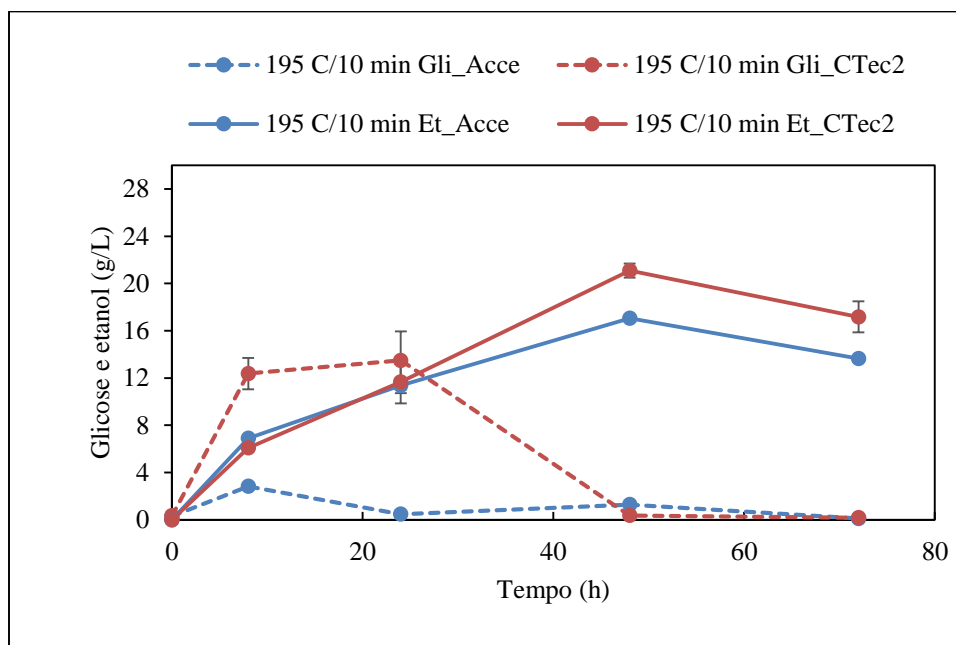
ordem de ácido acético < ácido levulínico < ácido fórmico. O teor de ácido alifático pode variar de acordo com a biomassa hidrolisada e o grau de severidade do pré-tratamento (Larsson et al., 1999).

Dessa forma, a hidrólise enzimática foi efetiva na temperatura ótima da enzima (50 °C), favorecendo também a hidrólise da hemicelulose que liberou o ácido acético. No entanto, a baixa concentração de ácido acético obtida durante a fermentação não prejudicou a produção de etanol em processo SHF, que alcançaram bons rendimentos em etanol como apresentado na Tabela 11.

4.4.5 SSF de comparação das enzimas Accellerase 1500 e Cellic CTec2

Realizou-se experimentos em processo SSF de comparação entre a enzima Accellerase 1500 e um complexo celulásico com alta atividade enzimática, Cellic CTec2. Os ensaios foram realizados em *shaker* a 37 °C com agitação de 250 rpm por 72 h. A carga enzimática utilizada foi de 20 FPU/g BCA tratado, carga de sólidos de 10% e a levedura foi a *S. cerevisiae* comercial. O pré-tratamento escolhido foi o hidrotérmico a 195 °C por 10 min. A Figura 37 apresenta a concentração de glicose e etanol durante os experimentos de SSFs.

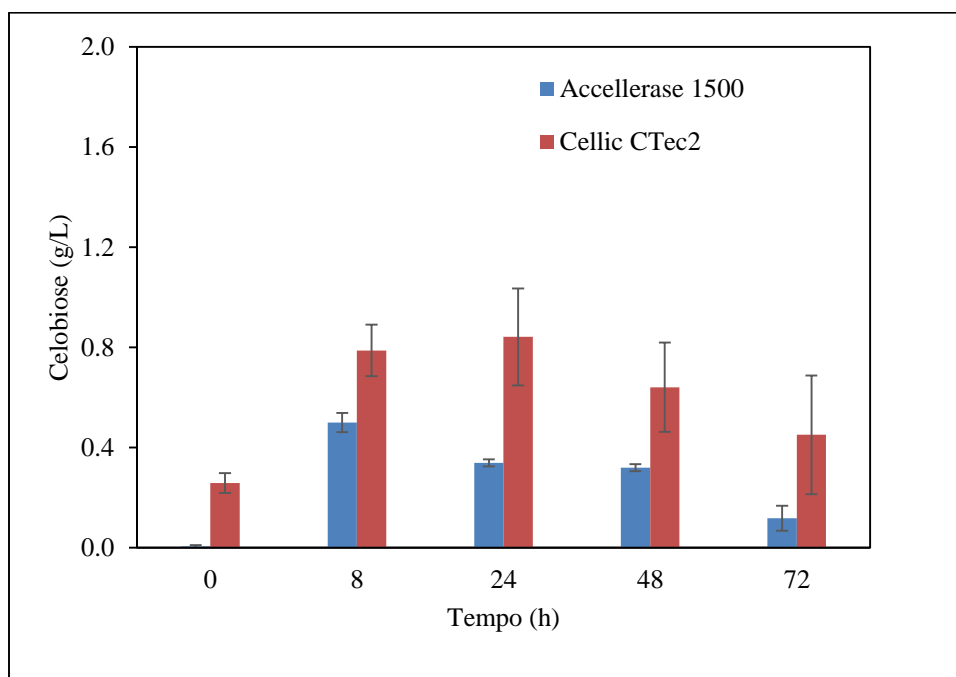
Figura 37. Concentração de glicose e etanol ao longo do tempo. Linhas tracejadas representam concentração de glicose e linhas contínuas concentração de etanol.



As celulases comerciais são misturas de enzimas com proporções variadas de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases com suplementares enzimas não-celulolíticas, como as hemicelulases (xilanases e manases) e pectinases. As misturas irão variar de acordo com o microrganismo produtor e o substrato sob o qual será cultivada. Todas essas enzimas atuam de maneira sinérgica para permitir a hidrólise da celulose na biomassa lignocelulósica, gerando a celobiose que será hidrolisada em glicose (Pryor e Nahar 2010).

Analisando os resultados obtidos da SSF notou-se que a velocidade inicial de hidrólise da Cellic CTec2 foi bem maior que a Accellerase 1500 sendo em 8 h as concentrações de glicose 12,4 e 2,7 g/L, respectivamente. E rapidamente a glicose obtida foi fermentada a etanol (Fig. 37). Em 24 h, a Cellic CTec2 obteve concentração máxima em glicose de 13,5 g/L. Estudos anteriores reportaram a comparação de três enzimas na hidrólise enzimática (Accellerase 1000, Spezyme e Celluclast) utilizando *switchgrass* pré-tratado com amônia aquosa em três diferentes temperaturas (40, 60 e 80 °C) e obtiveram como resultado uma menor conversão enzimática em 72 h para a Accellerase 1000 nas três condições de pré-tratamentos realizados. Esses autores relataram que essa limitação seria devido à celulase e não à falta de β -glicosidases, já que os autores obtiveram no final da hidrólise menores concentrações de celobiose (Pryor e Nahar 2010). A Figura 38 apresenta as concentrações de celobiose durante os ensaios de SSF.

Figura 38. Concentração de celobiose na SSF.



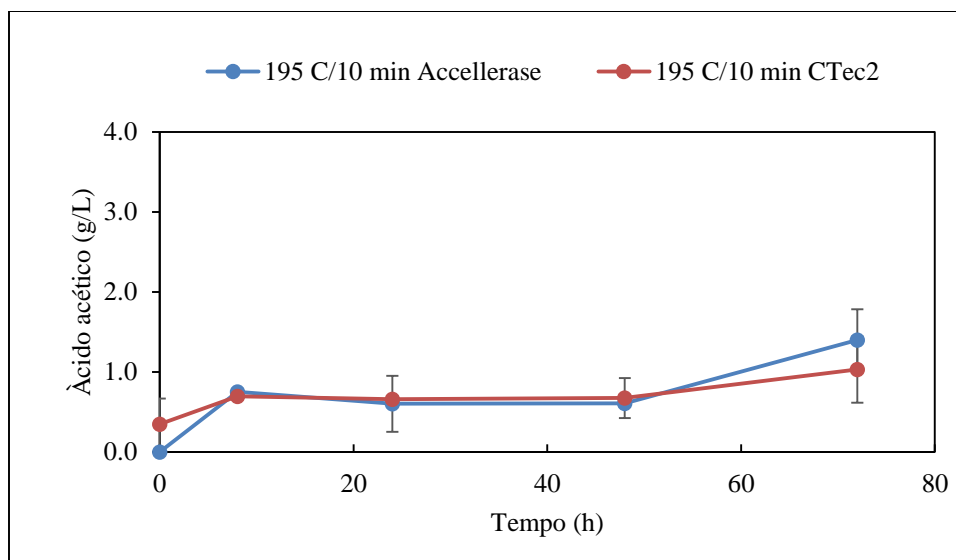
A observação da Figura 38 mostrou que a concentração final de celobiose no processo em SSF foi significativamente menor para a enzima Accellerase 1500 aproximadamente, 0,1 g/L enquanto que a Cellic CTec2 obteve em 72 h de SSF 0,5 g/L de celobiose. Portanto, observou-se o mesmo comportamento na concentração de celobiose dos autores Pryor e Nahar em 2010. Esses autores reportaram outra forte razão que limitaria as celulases na Accellerase 1000 seria a deficiência em enzimas hemicelulases, já que a Accellerase 1000 apresentou uma alta quantidade de β -glicosidase em relação aos outros complexos celulásicos, ou seja, uma alta quantidade de β -glicosidase seria às custas de uma baixa quantidade de enzimas suplementares (Kumar e Wyman, 2009; Pryor e Nahar, 2010).

Outros estudos investigaram as enzimas Accellerase 1500 e Cellic CTec com várias biomassas lignocelulósicas, sendo uma delas o *Erianthus* (capim) utilizando o pré-tratamento hidrotérmico e obtiveram com 5% de biomassa lignocelulósica 43 e 52% de conversão enzimática para Accellerase 1500 e Cellic CTec, respectivamente, em 72 h de sacarificação (Kawai et al., 2012). No presente trabalho as conversões enzimáticas em 72 h de SSF utilizando 10% de BCA foram de 55,9 e 67,3% para Accellerase 1500 e Cellic CTec2, respectivamente. Portanto, obteve-se para ambas as enzimas satisfatórias conversões em glicose em processo SSF.

Em 48 h, a concentração de etanol obtida pela CTec2 foi de 21,0 g/L enquanto que a Accellerase 1500 apresentou 17,1 g/L em etanol (Fig. 37). O rendimento em etanol foi de 66,6 e 53,8% para CTec2 e Accellerase 1500, respectivamente, ou seja, um aumento de 24% na obtenção de etanol para CTec2. Estudo anterior utilizando pré-tratamento ácido de gramíneas relatou que a Accellerase 1000 apresentou em processo SSF cerca de 10% a menos de rendimento em etanol em relação a enzima Celluclast (Pryor e Nahar, 2010).

O comportamento do ácido acético é apresentado na Figura 39. Observou-se que no início da SSF já havia um pouco de ácido acético cerca de 0,3 g/L para a Cellic CTe2, esse fato é devido a sua alta digestibilidade enzimática inicial, como mostrado na Figura 37. A hidrólise da celulose favoreceu a hidrólise da hemicelulose que liberou a partir do grupo acetil o ácido acético (Saha et al., 2013). Em 72 h de processo SSF a Accellerase 1500 apresentou uma maior concentração de ácido acético 1,4 g/L. Esse efeito pode ter sido potencializado pela metabolização do etanol pela levedura.

Figura 39. Concentração de ácido acético nos ensaios de SSF.



Com base nos resultados obtidos notou-se que complexos enzimáticos que apresentam uma maior quantidade de enzimas suplementares, neste caso a Cellic Ctec2, podem facilitar o sinergismo das celulases, aumentando a digestibilidade enzimática e, conseqüentemente, a produção de etanol 2G.

O pré-tratamento é a etapa fundamental na produção de etanol 2G. Um pré-tratamento eficiente consiste na remoção da hemicelulose, evitando a geração de inibidores, como o ácido acético e os furfurais para a levedura, mantendo a maior quantidade possível de celulose na biomassa. A deslignificação do material lignocelulósico pode em alguns casos deformar a estrutura original da biomassa, formando a pseudo-lignina, que é mais prejudicial que a lignina, diminuindo o rendimento da hidrólise enzimática.

Aumentar a acessibilidade das celulases à celulose para a obtenção de etanol 2G é um fator importante. Por isso, o pré-tratamento é requerido para diminuir a cristalinidade da celulose. O pré-tratamento hidrotérmico vem como uma das alternativas tecnológicas eficientes com baixo custo e não poluente, pois utiliza água como solvente, ou seja, não existe a necessidade de neutralização do produto final e evita-se problemas de corrosão. Como apresentado nesse projeto o pré-tratamento hidrotérmico mostrou ser eficiente na obtenção de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol 2G em processo PSSF, SSF e também SHF. Porém, o processo SSF apresenta vantagens de redução de custos operacionais e manuseio o que facilita a sua implementação em escala industrial.

4.5 Experimentos realizados no Departamento de Engenharia de Biosistemas e Agricultura da Universidade Estadual de Oklahoma no laboratório ATRC

Primeiramente, realizou-se a caracterização química (item 3.6) do BCA *in natura* e do BCA pré-tratado hidrotérmicamente a 195 °C/10 min na proporção 1:10 (m/m) com agitação de 200 rpm. A Tabela 12 apresenta a caracterização química do BCA em composição percentual dos seus principais constituintes (glucana, xilana, lignina e cinzas).

Tabela 12. Caracterização química dos BCAs.

Componentes (%)	<i>in natura</i>	195 °C/10 min
Glucana	41,7 ± 0,1	65,8 ± 1,5
Xilana	22,3 ± 0,3	3,7 ± 0,6
Galactana	1,8 ± 0,1	-
Arabinana	2,6 ± 0,4	0,1 ± 0,1
Manana	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,2
Lignina	20,1 ± 0,3	30,1 ± 1,3
Cinzas	4,3 ± 0,7	Nd ^b
Extrativos	5,9 ^a	Nd ^b

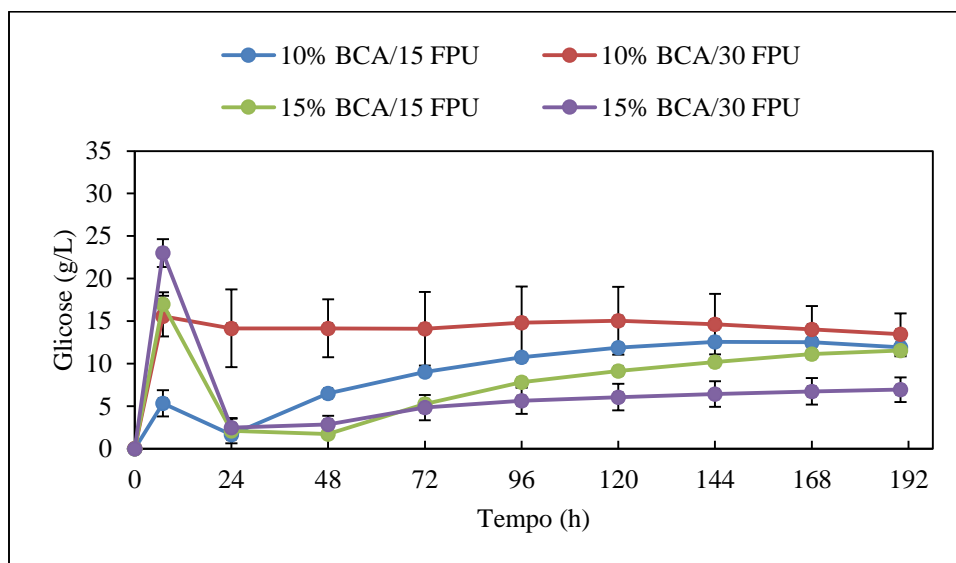
^(a) sem replicatas e ^(b) Nd: não determinado.

A partir dos dados apresentados na Tabela 12, observou-se que o BCA *in natura* contém 5,9% de extrativos, sendo 1,7% a partir do etanol e 4,2% da água. O teor de glucana foi de 41,7%, xilana de 22,3% e lignina 20,1%. Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos na literatura (Rocha et al., 2011; Wanderley et al., 2013).

A recuperação de sólidos após o pré-tratamento hidrotérmico foi de 62,0%, resultando em 97,8% de recuperação de glicose a partir da glucana e 10,3% de xilose foi recuperada pela fração da xilana. A lignina permaneceu com 90,1% na fração sólida após o pré-tratamento. Na literatura tem sido reportado aumento no teor de glucana de 38,1% para 62,6% e redução de xilana de 29,2% para 3,5% utilizando a palha da cana-de-açúcar pré-tratada hidrotérmicamente a 195 °C/10 min (Oliveira et al., 2014). Portanto, os dados obtidos nesses experimentos corroboram com os descritos na literatura. Na fração líquida do BCA pré-tratado os teores de açúcares foram: 3,3 g/L de glicose, 13,8 g/L de xilose, 1,0 g/L de galactose, 3,4 g/L de arabinose e 2,2 g/L de manose.

O BCA pré-tratado hidrotérmicamente a 195 °C/10 min foi empregado nos experimentos de SSF no laboratório ATRC. As condições experimentais das SSFs foram: (a) 10% BCA/15 FPU/g BCA tratado, (b) 10% BCA/30 FPU/g BCA tratado, (c) 15% BCA/15 FPU/g BCA tratado e (d) 15% BCA/30 FPU/g BCA tratado. Os ensaios foram realizados em *shaker* a 250 rpm a 45 °C utilizando a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* IMB3 com D.O de 5,0. Nos ensaios com 15% de sólidos utilizou-se microesferas metálicas para auxiliar na dissolução do BCA. A Figura 40 apresenta a concentração de glicose ao longo do tempo de SSF.

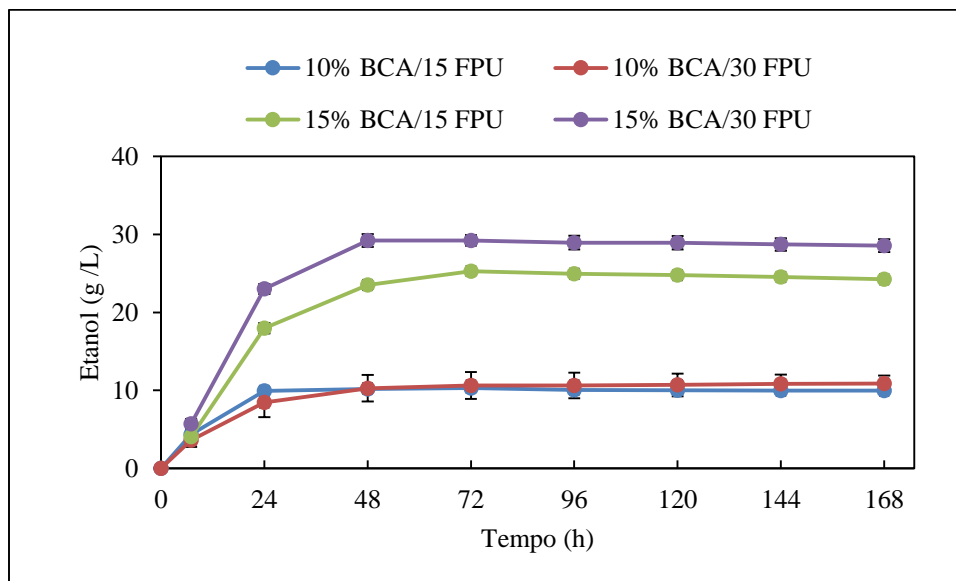
Figura 40. Concentração de glicose dos experimentos de SSF utilizando *K. marxianus* IMB3.



Analisando os dados obtidos (Fig. 40) notou-se que no início do processo SSF ocorreu um aumento no teor de glicose para todas as condições avaliadas. E logo em seguida, a glicose foi fermentada a etanol pela levedura *K. marxianus* IMB3 (Fig. 41). Nas primeiras 7 h a concentração máxima de glicose foi de 24,4 g/L para a condição (d), como mostra a Figura 40. Entre 7 e 24 h as condições (c) e (d) tiveram uma brusca queda nas concentrações de glicose e um rápido aumento nas concentrações de etanol (Fig. 41). Em 24 h de processo SSF todas as condições apresentavam concentrações de glicose de 2,1 g/L, exceto para a condição (b) 10% BCA/30 FPU. A condição (b) apresentou um acúmulo da concentração de glicose ao longo do tempo em média 14,2 g/L. A condição (d) 15% BCA/30 FPU apresentou baixa concentração de glicose (6,7 g/L) no final do processo SSF em relação as outras condições que obtiveram em média 11,1 g/L ou maior ao final

do processo. A Figura 41 apresenta a concentração de etanol no processo SSF utilizando a levedura *K. marxianus* IMB3.

Figura 41. Concentração de etanol dos experimentos de SSF utilizando *K. marxianus* IMB3.



A concentração de etanol aumentou para todas as condições avaliadas até 48 h, após esse tempo ocorreu estabilização da fermentação (Fig. 41). A estabilização da produção de etanol resultou em aumento da concentração de glicose (Fig. 40). Em 72 h, a hidrólise enzimática cessou, uma possível causa seria que a levedura foi inibida. A causa da inibição é desconhecida, alguns autores relatam que a combinação de altas temperaturas e baixa concentração de etanol a 45 °C pode diminuir a atividade celular da levedura (Suryawati et al., 2009; Pessani et al., 2011).

Ballesteros et al. (2004) reportaram utilizando a *K. marxianus* CECT 10875 a 42 °C em processo SSF a concentração de etanol cessou entre 72 e 96 h. Os autores atribuíram esse efeito ao estresse metabólico da levedura causado pela baixa concentração de glicose e pela presença de etanol no processo. Suryawati et al. em 2008, utilizando a *K. marxianus* IMB4 a 45 °C observou similar comportamento na produção de etanol. Os autores sugeriram a combinação de alta temperatura, concentração de etanol e baixo pH gerado a partir do ácido acético. A Tabela 13 mostra os dados obtidos durante o processo de SSF.

Tabela 13. Dados obtidos a partir dos ensaios de SSF em 72 h.

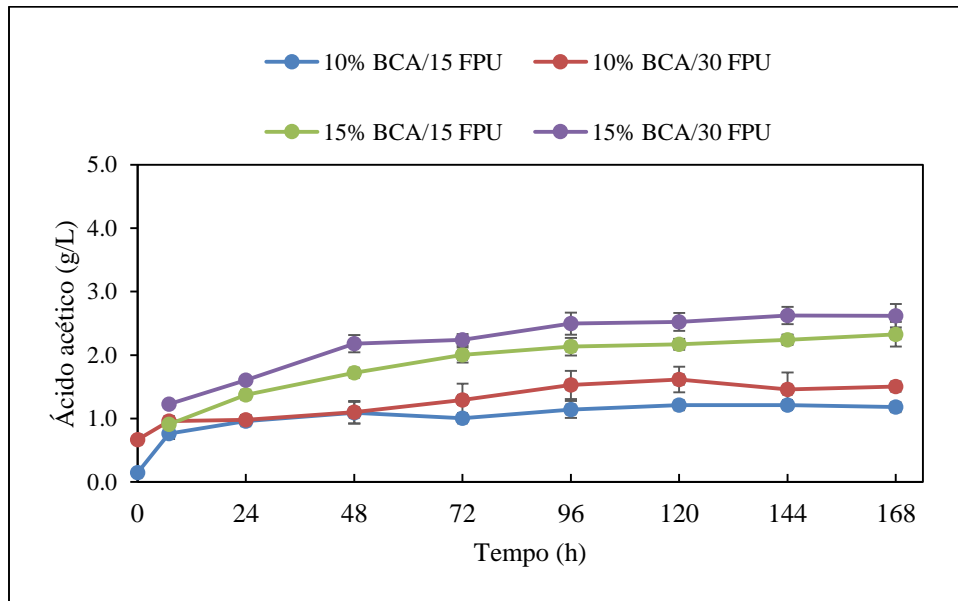
Condições das SSFs	C _{glicose} (%)	Etanol (g/L)	Y _{E/ET} (%)
10% BCA/15 FPU	46,1	10,3	31,2
10% BCA/30 FPU	55,3	10,6	33,8
15% BCA/15 FPU	56,9	25,3	48,1
15% BCA/30 FPU	64,3	29,2	58,9

C_{glicose}: conversão da celulose em glicose (%);

Y_{E/ET}: rendimento em etanol do processo de SSF, etanol obtido na SSF sob etanol teórico (%).

O aumento na carga de sólidos causou um aumento no rendimento em glicose (Tabela 13). A conversão máxima foi de 64,3% para a condição (d). Na comparação entre as cargas de sólidos de 10 e 15% notou-se um aumento no rendimento da hidrólise da celulose. Em 72 h obteve-se 55,3% de glicose para a condição (b). E o aumento na carga enzimática provocou um aumento na produção de etanol. A máxima concentração de etanol foi de 29,2 g/L condição (d), seguida pela condição (c) que apresentou concentração de etanol de 25,3 g/L. A Figura 42 mostra o perfil da concentração de ácido acético durante o processo de SSF.

Figura 42. Concentração de ácido acético nos ensaios de SSF utilizando *K marxianus* IMB3.



A análise do comportamento do ácido acético (Fig. 42) durante toda a SSF mostrou que a concentração máxima obtida foi de 2,6 g/L em 168 h de SSF para condição (d). A presença do ácido acético pode inibir o crescimento da levedura. A concentração de ácido acético para a condição (a) foi de 1,2 g/L no final da SSF (168 h). Em 72 h as concentrações de ácido acético foram 1,0, 1,3, 2,0 e 2,2 g/L para as condições (a), (b), (c) e (d), respectivamente. A formação de ácido acético durante a SSF pode inibir o crescimento da levedura (Silva et al., 2015).

Estudo anterior reportou a concentração de ácido acético em processo SSF com *K. marxianus* IMB3. Esses autores constataram que o aumento na concentração de ácido acético foi principalmente, devido ao metabolismo da levedura e não a partir da hidrólise enzimática da hemicelulose (Pessani et al., 2011).

Com base nos resultados obtidos observou-se que o BCA pré-tratado hidrotermicamente 195 °C/10 min foi eficiente na liberação de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol 2G. O presente projeto obteve 58,9% de rendimento em etanol com 15% de BCA utilizando 30 FPU de enzima. Em 72 h ocorreu o cessamento da produção de etanol que pode ter sido devido a utilização de alta temperatura e estresse da levedura.

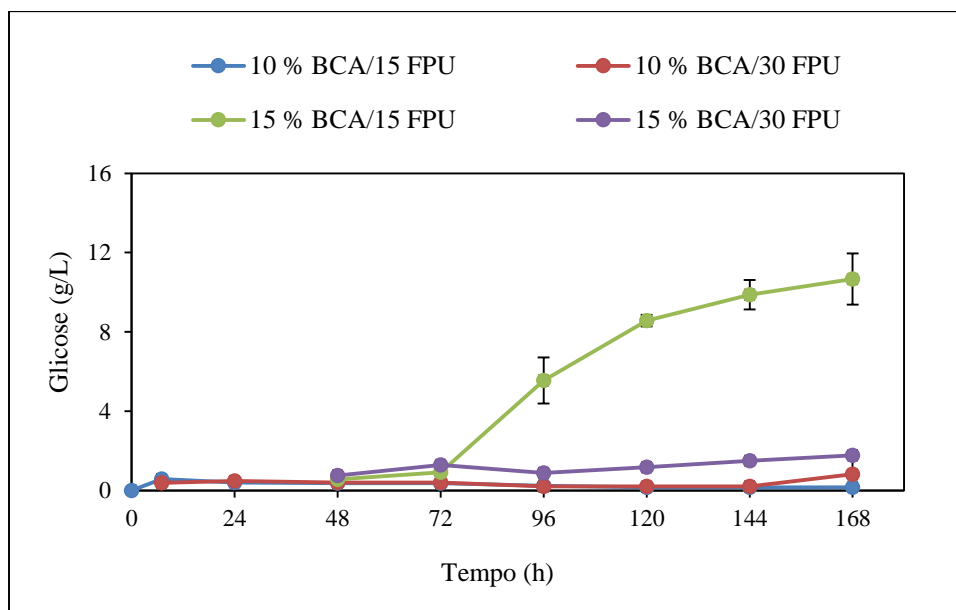
A partir desses resultados obtidos com a levedura termotolerante *K. marxianus* IMB3 propôs-se utilizar a levedura *S. cerevisiae* D5A utilizando as mesmas condições experimentais com intuito de avaliar a produção de etanol após 72 h de fermentação. Portanto, realizou-se um ensaio final utilizando a *S. cerevisiae* D5A com BCA pré-tratado hidrotermicamente a 195 °C/10 min.

Os ensaios utilizando a levedura *S. cerevisiae* D5A foram realizados em *shaker* a 250 rpm a 37 °C por 168 h com D.O de 0,5. As condições de SSFs foram as seguintes: (a) 10% BCA/15 FPU/g BCA tratado, (b) 10% BCA/30 FPU/g BCA tratado, (c) 15% BCA/15 FPU/g BCA tratado e (d) 15% BCA/30 FPU/g BCA tratado. Nos ensaios com 15% de sólidos adicionou-se microesferas metálicas para auxiliar na dissolução do BCA. A Figura 43 apresenta os resultados obtidos da concentração de glicose ao longo do tempo.

Analisando os dados notou-se que em 24 h de processo SSF as concentrações de glicose para as condições (a) e (b) foram < 0,5 g/L (Fig. 43). A dissolução do BCAs com 15% de sólidos ocorreu em 48 h, sendo em média 0,6 g/L. Após 48 h todas as condições avaliadas apresentaram um pequeno aumento na concentração de glicose, sendo a máxima concentração de glicose de 1,8 g/L para a condição (d). Porém, a condição (c) mostrou um acúmulo de glicose ao final da SSF, a causa é desconhecida.

Faga et al. (2010) também observaram aumento na concentração de glicose a partir de 72 h utilizando a levedura *S. cerevisiae* D₅A alcançando 3,7 g/L no final da SSF, na produção de etanol a partir de *switchgrass*. A Figura 44 apresenta a concentração de etanol durante o processo de SSF.

Figura 43. Concentração de glicose dos experimentos de SSF utilizando *S. cerevisiae* D₅A.



A concentração máxima de etanol foi de 42,6 g/L, para a condição com 15% BCA/30 FPU (Figura 44). As condições (a) e (b) apresentaram concentração de etanol de 21,0 e 25,0 g/L, respectivamente. A levedura *S. cerevisiae* D₅A mostrou ser eficiente a 37 °C, pois apresentou um alto rendimento em etanol de 76,2% para a condição (d) em 72 h de processo SSF (Tabela 14).

Estudos anteriores relataram 79% de rendimento em etanol utilizando *switchgrass* pré-tratado hidrotermicamente utilizando a levedura *S. cerevisiae* D₅A a 37 °C em 168 h de SSF (Suryawati et al., 2008). Outros autores reportaram utilizando BCA pré-tratado hidrotermicamente a 195 °C/20 min com 10% BCA/15 FPU/g celulose obtiveram concentração de etanol de 12,4 g/L e rendimento em etanol de 50,1% (da Cruz et al., 2012).

Entre 96 e 168 h as condições com 15% de BCA não apresentaram aumento na concentração de etanol. Para as condições (a) e (b) após 96 h ocorreu uma leve queda na produção de etanol, provavelmente, devido ao metabolismo da levedura. A produtividade volumétrica em etanol para as condições (c) e (d) foram 0,43 e 0,58 g/L.h, respectivamente em 48 h de SSF.

Moreno et al. em 2013 reportaram 0,39 g/L.h em 24 h utilizando palha de trigo hidrolisada com 15 FPU/g biomassa tratada. Em 2014, Li et al. empregando BCA pré-tratado com explosão a vapor (220 °C/5 min, proporção 1:1) alcançaram rendimento em etanol de 66,9% e Q_E de 0,19 g/L.h em 22 h. Dessa forma, os resultados obtidos na concentração e rendimento em etanol foram satisfatórios ou superiores aos reportados na literatura.

Figura 44. Concentração de etanol dos experimentos de SSF utilizando *S. cerevisiae* D5A.

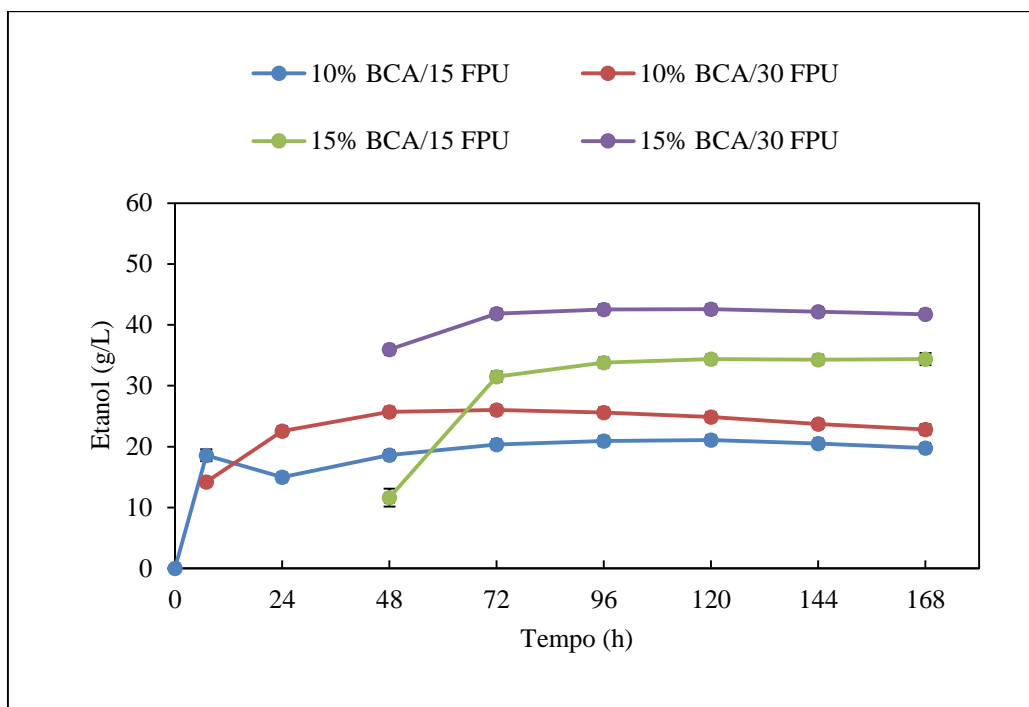


Tabela 14. Dados obtidos a partir dos ensaios de SSF em 120 h.

Condições das SSFs	C_{glicose} (%)	Etanol (g/L)	$Y_{E/ET}$ (%)	Q_E (g/L h)
10% BCA/15 FPU	56,8	21,1	56,6	0,39
10% BCA/30 FPU	67,0	25,0	66,7	0,54
15% BCA/15 FPU	71,2	34,2	61,7	0,43 ^a
15% BCA/30 FPU	77,2	42,6	76,2	0,58 ^a

C_{glicose} : conversão da celulose em glicose (%);

$Y_{E/ET}$: rendimento em etanol do processo de SSF, etanol obtido na SSF sob etanol teórico (%);

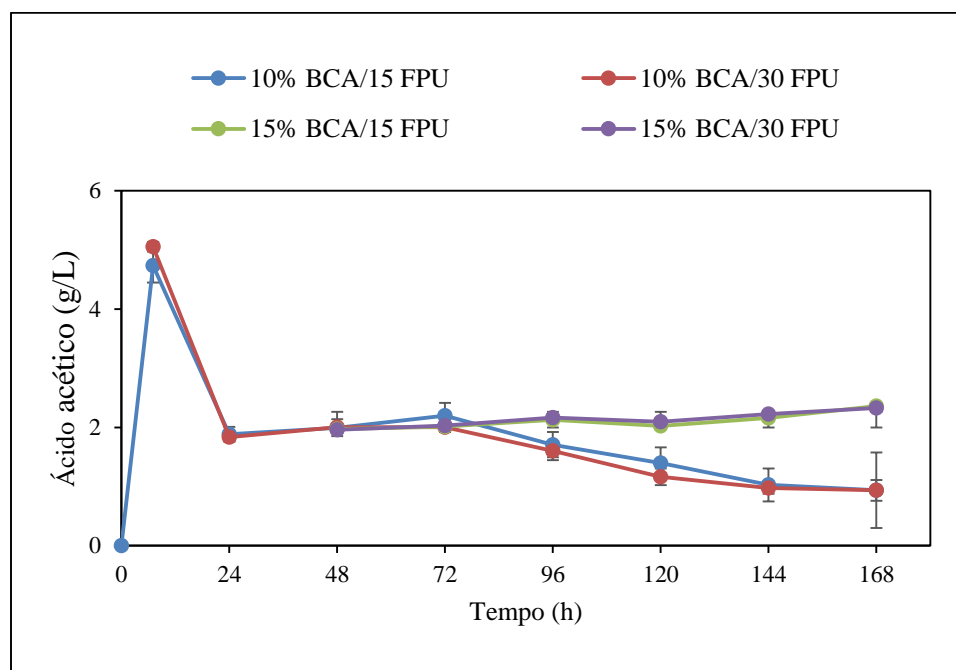
Q_E : produtividade volumétrica de etanol em 48 h de SSF;

^(a): em 72 h.

O comportamento do ácido acético foi observado durante todo o ensaio de SSF (Figura 45). Nas primeiras 7 h de hidrólise enzimática obteve-se uma alta quantidade de ácido acético nos hidrolisados (a) e (b) em média 5,0 g/L. Em 24 h houve uma grande diminuição na concentração de ácido acético em média 1,8 g/L. E após 72 h a concentração do ácido acético reduziu pela metade alcançando valor máximo de 0,9 g/L. Para as condições com 15% de BCA, (c) e (d), a produção de ácido acético ao longo da SSF quase não foi alterada e no final do processo obteve-se em média 2,3 g/L em 168 h.

A alta produção de ácido acético no início da SSF pode ter sido ocasionada pela hidrólise da hemicelulose liberando o ácido acético presente no grupo acetil (Hendriks e Zeeman, 2009). Com base nos dados apresentados notou-se o mesmo comportamento da *K. marxianus* IMB3 ocorreu com a *S. cerevisiae* D₅A, porém obteve-se com a *S. cerevisiae* D₅A maior rendimento e concentração em etanol (comparação das Tabelas 13 e 14).

Figura 45. Concentração de ácido acético nos ensaios de SSF com *S. cerevisiae* D₅A.



Comparando os resultados obtidos entre a *K. marxianus* IMB3 e a *S. cerevisiae* D₅A notou-se um aumento considerável em todas as condições avaliadas na produção de etanol. A concentração de etanol dobrou nas condições de 10% BCA com 15 e 30 FPU foi de 10,3 para 21,1 g/L e 10,6 para 25,0 g/L quando utilizou-se a *S. cerevisiae* D₅A, respectivamente, (Tabs.13 e 14).

No rendimento em etanol utilizando *S. cerevisiae* D₅A na condição de 15% BCA/30 FPU obteve-se um aumento de quase 30%. Estudo anterior relatou um maior rendimento em etanol para a levedura *S. cerevisiae* D₅A em relação a *K. marxianus* IMB3. Os autores utilizaram 5, 10 e 15 FPU/g glucana e obtiveram para a *K. marxianus* IMB3 46, 74 e 86% de rendimento em etanol, enquanto que para a *S. cerevisiae* D₅A os autores alcançaram 57, 86 e 92% de rendimento em etanol, respectivamente (Faga et al., 2010). Outros autores relataram que a *K. marxianus* suporta altas temperaturas em relação a *S. cerevisiae*, no entanto, a sua tolerância ao etanol é menor quando comparada a levedura *S. cerevisiae*, esse efeito está correlacionado com a atividade da membrana plasmática ATPase (Rosa e Sa-correia, 1992).

Para a finalizar o presente estudo compilou-se os experimentos realizados no doutorado, como mostra a Tabela 15. Os ensaios realizados na configuração PSSF mostraram satisfatórios resultados alcançando rendimento em etanol de 57,5% em 36 h de processo sendo 12 h de pré-sacarificação. Na configuração PSSF a hidrólise parcial da celulose em glicose no início do processo auxilia na agitação do substrato, principalmente com altas cargas de sólidos e propicia um aumento na produção de etanol durante o processo de SSF (Amores et al. 2013).

Analisando os pré-tratamentos realizados observou-se que a condição 195 °C/10 min apresentou satisfatória recuperação de sólidos (63,4%) e teor de celulose na fração sólida (55,7%). Na hidrólise e fermentação em processo SSF com meio tamponado os rendimentos em etanol foram de 53,8 e 60,0% com 10 e 15% de BCA, respectivamente. O aumento na carga de sólidos dificulta a agitação do substrato, porém eleva a concentração final do etanol. Contudo, para a produção de etanol é necessário alcançar uma concentração de etanol no mínimo 4% (m/v) para reduzir a demanda de energia e assim os custos no processo de destilação (Hoyer et al., 2013).

Os dados obtidos no processo SHF foram bem satisfatórios alcançando rendimento em etanol de 84% (39,9 g/L) com 15% de BCA na condição 195 °C/10 min. No processo SHF tem-se a vantagem de se operar no ótimo da enzima e da levedura independentemente (Erdei et al., 2012). Nos ensaios realizados com a levedura *K. marxianus* IMB3 obteve-se concentração de etanol de 29,2 g/L (58,9%) na condição 15% BCA/30 FPU quando utilizou-se a levedura *S. cerevisiae* D₅A alcançou-se na mesma condição concentração de etanol de 42,6 g/L (76,2%) acarretando em um aumento de quase 30% na concentração de etanol, aspecto também observado por Faga et al. em 2010.

Tabela 15. Resumo dos processos realizados nesse projeto.

Condições de pré-tratamento	Deslignificação NaOH (%)	pH 4,8	FPU/g BCA	Carga de sólidos (%)	Processo	C _{glicose} (%)	Etanol (g/L)	Y _{E/ET} (%)	Enz.	Lev.		
195 °C/10 min	-	+	20	10	PSSF	57,8	16,4	57,5	Accellerase 1500	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
170 °C/15 min		-			10	SSF	16,0	3,7			13,5	
		+					16,6	4,2			16,2	
195 °C/60 min		-					41,5	12,3			41,0	
		+					56,4	16,7			55,7	
195 °C/10 min		-					44,2	13,0			41,0	
		-					55,9	17,1			53,8	
		0,02					15	66,4			28,4	60,0
							10	41,1			13,5	40,6
							15	55,3			22,6	45,2
	0,5	10	38,9	13,2			38,4					
		10	SHF	79,3	25,4	80,4						
	15	88,5		39,9	84,0							
	0,02	10	74,2	25,7	77,0							
	0,5		72,7	26,3	76,4							
-	+	10	SSF	67,3	21,0	66,6	Cellic CTec2					
		15	SSF	46,1/55,3	10,3/10,6	31,2/33,8	Accellerase 1500	<i>K.marxianus</i>				
		30		56,9/64,3	25,3/29,2	48,1/58,9		IMB3				
		15		56,8/67,0	21,1/25,0	56,6/66,7		<i>S. cerevisiae</i>				
	30	71,2/77,2		34,2/42,6	61,7/76,2	D ₅ A						
	5,5	10/15	10	SSF	67,3	21,0	66,6	Accellerase 1500	<i>S. cerevisiae</i>			
										15		
										30		
15												

Enz: enzima, Lev: levedura, (-) sem deslignificação e/ou meio não tamponado e (+) com meio tamponado.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pôde-se concluir que o bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é uma biomassa lignocelulósica promissora para a produção de etanol 2G. A etapa fundamental para a obtenção de maiores rendimentos em etanol é a etapa de pré-tratamento e a sua eficiência está relacionada com a máxima conversão enzimática dos açúcares fermentescíveis em etanol.

O pré-tratamento hidrotérmico a 195 °C/10 min mostrou ser, dentre as condições avaliadas, a melhor condição na obtenção de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol 2G. Os resultados mostraram teor de celulose de 55,7% com recuperação de sólidos de 63,4%. Nessa condição obteve-se alta remoção de hemicelulose alcançando 83,7%. E apresentou baixa concentração de inibidores.

A deslignificação do material não favoreceu o aumento na obtenção de açúcares na hidrólise enzimática. Uma das possíveis causas seria a deformação da lignina, gerando a pseudo-lignina, que é mais prejudicial que a lignina, diminuindo a digestibilidade enzimática. Do ponto de vista econômico, se a etapa de deslignificação não provocar um aumento significativo na produção de açúcares fermentescíveis, torna-se desnecessária a deslignificação, pois acarretará em um custo adicional ao processo.

Em processo SSF, o BCA pré-tratado hidrotermicamente a 195 °C/10 min utilizando 10% de sólidos obteve 55,9% de conversão enzimática e rendimento em etanol de 53,8% em 48 h de SSF. Utilizando 15% de sólidos a máxima concentração de etanol foi de 28,4 g/L e rendimento em etanol de 60,0% em 72 h. O aumento da carga de sólidos favoreceu uma maior concentração de etanol. No processo PSSF a pré-sacarificação favoreceu um maior rendimento em etanol de 57,5% com 10% de BCA em 36 h. O processo PSSF tem sido muito descrito na literatura por impulsionar a fermentação dos açúcares.

Na configuração SHF com 15% de BCA obteve-se altas concentração e rendimento em etanol foram de 39,9 g/L e 84,0%, respectivamente, devido ao fato de se operar nas temperaturas ótimas da enzima e da levedura independentemente.

A levedura termotolerante *K marxianus* IMB3 apresentou resultados satisfatórios e o rendimento em etanol foi de 58,9%, sendo 29,2 g/L de concentração de etanol na condição com

15% de sólidos utilizando 30 FPU/g BCA tratado em processo SSF. Utilizando a levedura *S. cerevisiae* D₅A elevou-se o rendimento em etanol para 30%.

O BCA apresenta grande quantidade de celulose que pode ser convertida a etanol, todavia a recalcitrância da biomassa lignocelulósica impossibilita a acessibilidade das celulasas a celulose o que torna o pré-tratamento da biomassa fundamental para aumentar a digestibilidade enzimática. A utilização de diferentes configurações de processo de hidrólise enzimática e fermentação mostrou a dificuldade de se escolher um processo que obtenha alto rendimento em etanol com facilidade na agitação do substrato. Dessa forma, no presente trabalho várias possibilidades apresentaram ser eficiente na obtenção de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol 2G, entretanto, a utilização de altas cargas de substrato mostrou que a configuração SHF apresentou o melhor rendimento em etanol.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATZOGLOU, N. et al. Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosic fractionation. **Chemical Engineering Science**, 47:1109-1122, 1992.

ADEL, A. M. et al. Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part 1. Acid catalyzed hydrolysis. **Bioresource Technology**. V. 101, 4446-4455, 2010.

AITA, G. M.; KIM, M. Pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic materials to bioethanol. In: Sustainability of the sugar and sugar ethanol industries. **American chemical Society**, p. 117-145, 2010.

AKIYA, N.; SAVAGE, P. E. Roles of water for chemical reactions in high-temperature water. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 2725-2750, 2002.

ALEXANDER, M. A.; JEFFRIES, T. W. Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 1, p. 2-19, jan. 1990.

ALRIKSSON, B.; CAVKA, A.; JÖNSSOM, L. J. Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents. **Bioresource Technology**, 102:1254-1263, 2011.

AMORES, I. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. **Electronic Journal of Energy and Environment**, v. 1, p. 25-36, 2013.

ANDERSON, E.; MECHTMAN, J.; SEELEY, M. Hemicelluloses from cottonseed hulls. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 175-179, nov. 1938.

ANDERSON, P. J.; McNEIL, K.; WATSON, K. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperature above 40 °C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. **Applied Environmental Microbiology**, v. 51, p. 1314-1320, 1986.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, 4:3, 2011.

BABIKER, M. et al. High-temperature fermentation: how can process for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology Biotechnology**, 85:861-867, 2010.

BACOVSKY, D. et al. **Status of advanced biofuel demonstration facilities in 2012**. In Status of Advanced biofuels demonstration facilities in 2012: A report to IEA bioenergy task 39. Ottawa, ON: EIA Bioenergy Task 39, 2013.

BALAN, V.; CHIARAMONTI, D.; KUMAR S. Review of US and EU initiatives toward development, demonstration, and commercialization of lignocellulosic biofuels. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, doi 10.1002/bbb.1436, 2013.

BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress of Energy Combined Science**, v. 34, p. 551-573, out. 2008.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (BNDES); CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE) (Org.). **Bioetanol de Cana de Açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, Nov. 2008. 316 p.

BARNET, J. A. The utilization of sugars by yeast. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 32, p. 126-234, 1976.

BANERJEE, S. et al. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 4:77-93, 2009.

BEESON, W. T. et al. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent metalloenzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. **Applied Environmental Microbiology**, 77:7007-7015, 2012.

BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, jan. 1994.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. **Progress in Polymer Science**, v. 19, p. 797-841, 1994.

BOBLETER, O.; BONN, G.; PRUTSCH, W. **Steam explosion-hydrothermolysis-organosolv. A comparison**. In: Focher, B. Marzetti, A. Crescenzi, V. (Eds), Steam explosion techniques. Gordon and Breach, Philadelphia, pp. 59-82, 1991.

BOUCHARD, J. et al. Analytical methodology for biomass pretreatment. Part 2: Characterization of the filtrates and cumulative product distribution as a function of treatment severity. **Bioresource Technology**, 36:121-131, 1991.

BOUSSARSAR, H.; ROGÉ, B.; MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6537-6542, 2009.

BRASILEIRO, L. B.; COLODETTE, J. L.; PILÓ-VELOSO, D. A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 819-829, abril 2001.

CANASAT, 2012. **Monitoramento da colheita de cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.dsr.inpe.br/laf/canasat/colheita.html>. Acesso em: 8 de jan. 2015.

CANTAREL, B. L. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acid Research**, 37:233-238, 2009.

CANTARELLA, M. et al. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. **Process Biochemistry**, 31:1533-1542, 2004.

CARPITA, N. et al. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. **Science (Washington, D. C.)**, 205:1144-1147, 1979.

CARRASCO, C. et al. SO₂-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. **Enzyme Microbial Technology**, v. 46, p. 64-73, 2010.

CHANDEL, A. K. et al. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, 87:11-20, 2012.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass: A potential and promising method for enhanced methane production. **Applied Energy**, v. 94, p. 129-140, 2012.

CHUM, H. L. et al. Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 24/25:1-14, 1990.

CHUNDAWAT, S. P. S. et al. Restructuring the crystalline cellulose hydrogen bond network enhances its depolymerization rate. **Journal of the American Chemical Society**, 133: 11163-11174, 2011.

CONVERSE, A. O. et al. Kinetics of thermochemical pretreatment of lignocellulosic materials. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 20/21, p. 63-78, 1988.

CYBULSKA, I. et al. Chemical characterization and hydrothermal pretreatment of salicornia bigelovii straw for enhanced enzymatic hydrolysis and bioethanol potential. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 165-172, 2014.

Da CRUZ, S. H. et al. Hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse using response surface methodology improves digestibility and ethanol production by SSF. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 39, p. 439-447, 2012.

DÁRIO, M. G. et al. Fermentação de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deletadas no gene SUC2. **54º Congresso Brasileiro de Genética**, Salvador, set. 2008.

DAVISON, B. H. et al. Variation of S/G ratio and lignin content in a Populus family influences the release of xylose by dilute acid hydrolysis. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 129-132:427-435, 2005.

DAVISON, B. H. et al. Plant cell walls: basics of structure, chemistry, accessibility and the influence on conversion. **John Wiley & Sons Ltd.**, 23-38, 2013.

DeMARTINI, J. D. et al. application of monoclonal antibodies to investigate plant cell wall deconstruction for biofuels production. **Energy Environment Science**, v. 4, p. 4332-4339, 2011.

DIAS, M. O. M. et al. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, 102:8964-8971, 2011.

DIMAROGANA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cellulose degradation by oxidative enzymes. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, doi: e201209015, 2012.

DING, S. Y. et al. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility? **Science**, v.338, p. 1055-1060, 2012.

DIVNE, C. et al. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Science**, 65: 524-528, 1994.

DONOHUE, B. S. et al. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical retreatment. **Biotechnology Bioengineering**. v. 101, p. 913-925, 2008.

DOWN, N.; McMILLAN, J. SSF experimental protocols: lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation. Golden, CO: **National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, 2008.

ENTIAN, K. D.; BARNETT, J. A. Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 17, n. 12, p. 506-510, dez. 1992.

ENSINAS, A. V. et al. Analysis of process steam demand reduction and electricity generation in sugar and ethanol production from sugarcane. **Energy Conversion and Management**, 48:2978-2987, 2007a.

ENSINAS, A. V. et al. Design of evaporation systems and heaters networks in sugar cane factories using a thermoeconomic optimization procedure. **International Journal Thermodynamics**, 10:97-105, 2007b.

ERDEI, B. et al. Separate hydrolysis and co-fermentation for improved xylose utilization in integrated ethanol production from wheat meal and wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, 5:12, 2012.

ESTEGHLALIAN, A. et al. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 129-136, mar. 1997.

FAGA, B. A.; WILKINS, M. R.; BANAT, I. M. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D5A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2273-2279, 2010.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. Cellulose hydrolysis. **Springer -Verlag**. New York, v. 3, 1987.

FRANCO, H. C. J. et al. How trash to removal from sugarcane field to produce bioenergy? Campos do Jordão: **1st Brazilian Bioenergy Sci. Technol. Conf.**, 2011.

FRANCO, H. C. J. et al. Assessment of sugarcane trash for agronomic and energy purposes in Brazil. **Scientia Agricola**, p. 305-312, 2013.

FRANCÓ, B. et al. Influence of bark on fuel ethanol production from steam-pretreated spruce. **Biotechnology for Biofuels**, 8:15, 2015.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure and Reactions**. Berlin, Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FONSECA, G. G. et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potencial. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 79, p. 339-354, 2008.

FOSTON, M.; RAGAUSKAS, A. J. Biomass characterization: recent progress in understanding biomass recalcitrance. **Industrial Biotechnology**, 8:191-208, 2012.

FORESTRY COMMISSION. **Extraction Technologies for Tree Metabolites**. Disponível em: <http://tree-chemicals.csl.gov.uk/review/extraction.cfm>. Acesso em: 8 jan. 2015.

FORSBERG, Z. et al. Cleavage of cellulose by a CBM33 protein. **Science**, 330:219-222, 2010.

FORTES, C. et al. Recovery of nitrogen (¹⁵N) by sugarcane from previous crop residues and urea fertilization under a minimum tillage system. **Sugar Tech**, 13:42-46, 2011.

FRANCK, EU. Fluids at high pressures and temperatures. **Pure Applied Chemical**, v. 59, n. 1, p. 25-34, 1987.

GALBE, M.; ZACCHI, G. pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, 46:70-78, 2012.

GALDOS, M. et al. Trends in global warming and human health impacts related to Brazilian sugarcane ethanol production considering black carbon emissions. **Applied Energy**, 104:576-582, 2013.

GAO, D. et al. Lignin triggers irreversible cellulase loss during pretreated lignocellulosic biomass saccharification. **Biotechnology for Biofuels**, 7:175, 2014.

GARCÍA-APARICIO, M. P. et al. Second ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Fuel**. V. 90, p. 1624-1630, 2011.

GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials, **Hotzals Roh-und Werstoff**, v. 57, p. 191-202, 1999.

GAUSS, W. F.; SUZUKI, S.; TAKAGI, M. **Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments**. V. 3990944. (Ed) Office USPT. USA, Bio research Center Company Limited: 1976.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n.2, p. 257-268, 1987.

GIRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, 101:4775-4800, 2010.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GREEG, D.; SADDLER, J. N. A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. **Applied Biochemistry Biotechnology**, p. 179-193, 1996.

GRUBB, C. F.; MAWSON, A. J. Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. **Biotechnology Lett**, v. 15, p. 621-626, 1993.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends Biotechnology**, v. 29, p. 419-425, 2011.

HACKING, A. J.; TAYLOR, I. W. F.; HANAS, C. M. selection of yeasts able to produce ethanol from glucose at 40 °C. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 19, p. 361-363, 1984.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.

HEITZ, M. et al. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. **Bioresource Technology**, 35:23-32, 1991.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatment to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p 10-18, 2009.

HOLTZAPPLE, M.T.; LUNDEEN, J. E.; STURGIS, R. Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34/35, p. 5-21, 1992.

- HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, 5:45, 2012.
- HOYER, K. et al. Influence of fiber degradation and concentration of fermentable sugars on simultaneous saccharification and fermentation of high-solids spruce slurry to ethanol. **Biotechnology for Biofuels**, 6:145, 2013.
- HU, F.; JUNG, S.; RAGAUSKAS, A. Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 7-12, 2012.
- HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrate by the addition of accessory such as xylanase: is it na additive or synergistic effect? **Biotechnology and Bioengineering**, 4:36, 2011.
- HU, Z.; RAGAUSKAS, A. J. Hydrothermal pretreatment of switchgrass. **Industrial Engineering Chemical**, v. 50, p. 4225-4230, 2011.
- HUANG, R. et al. Understanding the key factors for enzymatic conversion of pretreated lignocellulose by partial least square analysis. **Biotechnology Progress**, V. 26, p. 384-392, 2010.
- JACOBSEN, S. E.; WYMAN, C. E. Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 41, p. 1454-1461, 2002.
- JAYARAMAN, K. Manufacturing sisal-polypropylene composites with minimum fibre degradation. **Composites Science and Technology**, v. 63, p. 367-374, 2003.
- JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, 6:16, 2013.
- JORGENSEN, H. et al. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentration. **Biotechnology and Bioengineering**, 96: 862-870, 2007.
- KAWAI, T. et al. Analysis of the saccharification capability of high-functional cellulase JN11 for various pretreated biomasses through a comparison with commercially available counterparts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 39:1741-1749, 2012.
- KIM, M.; AITA, G.; DAY, D. F. Compositional in sugarcane bagasse on low temperature, long-term diluted ammonia treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 34-40, nov. 2009.
- KIM, T. H.; NGHIEM, N. P.; HICKS, K. B. Pretreatment and fractionation of corn stover by soaking in ethanol and aqueous ammonia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, p. 171-179, jan. 2009.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the pulp and paper industry**. New York: John Wiley, p. 273-308, 1998.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International Sugar Journal**, v.106, n.1263, p. 147-150, 2004.

KOPPRAM, R. et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production using corncobs at lab, PDU and demo scales. **Biotechnology for Biofuels**, 6:2, 2013.

KOPPRAM, R.; OLSSON, L. Combined substrate, enzyme and yeast feed in simultaneous saccharification and fermentation allow bioethanol production from pretreated spruce biomass at high solids loadings. **Biotechnology for Biofuels**, 7:54, 2014.

KOSTYLEV, M.; WILSON, D. B. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. **Biofuels**, 3:61-70, 2012.

KUMAR, L. et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 201-208, 2012.

KUMAR, R. WYMAN, C. E. Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. **Biotechnology and Bioengineering**, 103:252-267, 2009.

KUMAR, R. WYMAN, C. E. Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solids pretreated by leading technologies. **Biotechnology Progress**, v. 25, p. 302-314, 2009.

KUMAR, S. et al. Hydrothermal pretreatment of switchgrass and corn stover for production of ethanol and carbon microspheres. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 956-968, 2011.

KUMAR, S.; GUPTA, R. B. Biocrude production from switchgrass using subcritical water. **Energy and Fuels**, v. 23, p. 5151-9, 2009.

KURTZMAN, C. P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, p. 233-245, 2003.

LACHANCE, M. A. Current status of *Kluyveromyces* systematics. **FEMS yeast**, v. 7, p. 642-645, 2007.

LANGAN, P. et al. Cutting-edge research for a green sustainable future. **Green Chemistry**, v. 16, p. 63-68, 2014.

LARSSON, S. et al. comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 79:694-700, 1999.

- LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 1081-1099, 2005.
- LAXMAN, R. S.; LACHKE, A. H. Bioethanol from lignocellulosic biomass, part 1: pretreatment of the substrates. In: Pandey A, editor. Handbook of plant-based biofuels. **CRC Press**, p. 121-9, 2008.
- LEAL, M. R. L. V.; NOGUEIRA, L. A.H.; CORTEZ, L. A. B. Land demand for ethanol production. **Applied Energy**, 102:266-271, 2013.
- LEE, Y. H.; FAN, L. T. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis insoluble cellulose (II). **Biotech and Bioengineering**, 25: 959-966, 1983.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, K. Y. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2006.
- LEI, H.; CYBUSLKA, I.; JULSON, J. Hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass and kinetics. **Science Research**, v. 3, p. 250-259, 2013.
- LEU, S-Y, ZHU, J. Y. Substrate-related affecting enzymatic saccharification of lignocellulosic: our recent understanding. **BioEnergy Research**, 6:405-415, 2013.
- LI, J. B. et al. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3061-3068, 2007.
- LI, J. et al. One-pot simultaneous saccharification and fermentation: A preliminary study of a novel configuration for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 16, p. 171-178, 2014.
- LI, J. et al. Effect of antioxidant extraction on the enzymatic hydrolysis and bioethanol production of the extracted steam-exploded sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, 91-96, 2014.
- LI, X. et al. Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases. **Structure**, 20:1051-1061, 2012.
- LIN, Y.; TANAKA, S. ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 627-642, 2006.
- LIU, C.; WYMAN, C. E. Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1978-1985, 2005.
- LIU, C.; WYMAN, C. E. The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. **Industrial of Engineering. Chemistry Research**, V. 42, p. 5409-16, 2003.

- LODDER, J.; KREGER-van RIJ, N. J. W. The yeasts: a taxonomic study. **NHPC**, Amsterdam, 1952.
- LORA, J. H.; WAYMAN, M. Delignification of hardwoods by autohydrolysis and extraction. **Tappi Journals**, v. 61, p. 47-50, 1978.
- LOVE, G. et al. Ethanol production at 45 °C using preparations of *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in calcium alginate and kissiris. **Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 275-277, 1996.
- LOVE, G. et al. Continuous ethanol fermentation at 45 °C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in calcium alginate and kissiris. **Bioprocess Engineering**, v. 18, p. 187-189, 1998.
- LUO, X.; ZHU, J. Y. Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 92-99, 2010.
- MABEE, W. E.; SADDLER, J. N. Bioethanol from lignocellulosics: status and perspectives in Canada. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4806-4813.
- MACEDO, I.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Green house gases emissions in the production and use ethanol from sugarcane in Brazil: the 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, 32:582-595, 2008.
- MACRELLI, S.; MOGENSEN, J.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, 5:22, 2012.
- MACRELLI, S.; GALBE, M.; WALLBERG, O. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. **Biotechnology for Biofuels**, 7:26, 2014.
- MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Bioengineering**, 25:103-121, 1983.
- MARTINS, C. A. P. **Avaliação do Efeito do Inóculo e do Perfil de Alimentação do Mosto na Produção em Escala Piloto e Industrial de Etanol**. 80 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, 2009.
- MASARIN F. et al. Chemical composition and enzymatic digestibility of sugarcane clones selected for varied lignin content. **Biotechnology for Biofuels**, 4:55, 2011.
- MARTÍNEZ, J. M. et al. Soda-antraquinone pulping of a softwood mixture: applying a pseudo-kinetic severity parameter. **Bioresorce Technology**, 60:161-167, 1997.

McGINNIS, G. D.; WILSON, W. W.; MULLEN, C. E. Biomass pretreatment with water and high-pressure oxygen. **Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development**, v. 22, n. 2, p. 352-357, jun. 1983.

McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E; BAKER, J. O; OVEREND, R. P. (Eds), **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. American Chemical Society, Washington, DC, p. 292-324, 1994.

MOISER et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresouce Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

MOHAGHEGHI, A. et al. High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 33: 67-81, 1992.

MOK, W. S.; ANTAL, M. J.; VARHEGYI, G. Productive and parasitic pathways in dilute acid-catalyzed hydrolysis of cellulose. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 31, n. 1, p. 94-100, 1992.

MONTANÉ, D. et al. Phenomenological kinetics of wood delignification: application of a time-dependent rate constant and a generalized severity parameter to pulping and correlation of pulp properties. **Wood Science Technology**, 28:387-402, 1994.

MOREIRA, A.L. et al. Dosagem de ácido láctico na produção de etanol a partir da cana de açúcar. **Biológico**, v. 70, n. 1, p. 35-42, jan/jun. 2008.

MORENO, A. D. et al. Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass with laccase. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 239-245, 2013.

NARENDRANATH, N.; THOMAS, K.; INGLEDEW, W. Effects acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 26:171-177, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Savier Editora, 2002.

NOVA CANA. **Mistura de álcool na gasolina**. Disponível em: <http://www.novacana.com/tag/93-mistura-de-alcool-na-gasolina/>. Acesso em: 05 mar. 2015.

ÖHGREN, K. et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. **Science Direct**, v. 126, p. 488-498, 2006.

ÖHGREN, K. et al. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2503–2510, 2007.

ÖHGREN, K. et al. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreatment corn stover. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 834-839, 2007.

OLIVEIRA, L. R. M. et al Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, 58:1-7, 2014.

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

OLSSON, C.; WESTMAN, G. **Direct dissolution of cellulose: background, means and application**. Cap. 6, Intech, 2013.

OVEREND, R. P.; CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosic by stream-aqueous pretreatments. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 321, p. 523-536, 1987.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. **Current Opinion in Plant Biology**, 13:304-311, 2010.

PAN, X.; GILKES, N.; SADDLER, J. N. Effect of acetyl groups on enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. **Hotzforschung**, 60:398-401, 2006.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 17-24, 2000.

PETTERSEN, R. C. The chemical composition of wood (Chapter 2). In: Rowell R. M. (ed), The chemistry of solid wood. **Advances in Chemistry Series**, v. 207. American Chemical Society, Washington, DC, p. 984, 1984.

PEREZ, J. A. et al. Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. **Fuel**, v. 87, p. 3640-3647, 2008.

PESSANI, N. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: the effect of enzyme loading temperature and higher solid loadings. **Bioresource Technology**, 102:10618-10624, 2011.

PHILIPPIDIS, G.P.; SMITH, T.K. Limiting factor in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.51/52, p. 117-124, 1995..

PIETAK, A. et al. Novel technique for characterizing the surface of natural fibres. **Applied Surface Science**, v. 253, p. 3627-3635, 2007.

PHILLIPS, C. M. et al. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. **ACS Chemical Biology**, 61:1399-1406, 2011.

POLETTO, M. et al. Structural characteristics and thermal properties of native cellulose. **Intech**, Chapter 2, doi.org/10.5772/50452, 2013.

PORRO, D. et al. Flow-cytometric determination of the respiratory activity in growing *Saccharomyces cerevisiae* populations. **Biotechnology Progress**, v. 10, n. 2, p. 193-197, mar. 1994.

PRYOR, S. W.; NAHAR, N. Deficiency of cellulase activity measurements for enzyme evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 162:1737-1750, 2010.

PU, Y. et al. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. **Biotechnology for Biofuels**, 6:15, 2013.

QING, Q.; WYMAN, C. E. Supplementation with xylanase and beta-xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 18-29, 2011.

QUINLAN, R. J. et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, 108:15079-15084, 2011.

RAGAUSKAS, A. J. et al. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science (Washington DC, US)**, 311:484-489, 2006.

REN, J.L.; SUN, R.C.; PENG, F. Carboxymethylation of hemicelluloses isolated from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, n. 4, p. 786-793, abr. 2008.

RENOUF, M. A.; WEGWNER, M. K.; NIELSEN, L. K. An environmental life cycle assessment comparing Australian sugarcane with US corn and UK sugar beet as producers of sugar for fermentation. **Biomass and Bioenergy**, 32:1144-1155, 2008.

RETTORI, D.; VOLPE, P. L. O. Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 23, n. 2, 2000.

ROCHA, G. J. M. et al. Resumos do 5th Brazilian symposium on the chemistry of lignins and other wood components, Paraná, Brasil, 1997.

ROCHA, G. J. M. et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, 35:663-670, 2011.

ROGALINSKI, T.; INGRAM, T.; BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. **Journal supercritical Fluids**, v. 47, p. 54-63, 2008.

ROSA, F. M.; Sa-CORREIA, I. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 23-27, 1992.

ROUWENHORST, R. J. et al. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied Environment Microbiology**, v. 54, p. 1131-1137, 1988.

RUIZ, H. A. et al. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharification cerevisiae* strain – Effect of process conditions. **Fuel**, v. 95, p. 528-536, 2012.

RUFFELL, J. **Pretreatment and Hydrolysis of Recovered Fiber for Ethanol Production**. Master degree, The University of British Columbia, Vancouver. Chemical and Biological Engineering, 2008, 110 p.

SAHA, B. C. et al. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient production. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 367-372, 2013.

SANNIGRAHI, P. et al. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. **Energy Environment**, v. 4, p. 1306-1310, 2011.

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

SAVAGE, P. E. Organic chemical reactions in supercritical water. **Chemical Rev.** v. 99, p. 603-21, 1999.

SELIG, M. J. et al. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 1333-1339, 2007.

SELIG, M. J. et al. The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 155:397-406, 2009.

SEVERO, J. R. **O Álcool, O Brasil E O Mundo**, Disponível em: <http://www.canaldoprodutor.com.br/comunicacao/artigos/o-alcool-o-brasil-e-o-mundo>. Acesso em: 10 dez. 2009.

SILALERTRUKSA, T.; GHEEWALA, S. H. Long-term bioethanol system and its implications on GHG emissions: a case study of Thailand. **Environmental Science Technology**, 45:4920-4928, 2011.

SILVA, G. M. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol**. 104 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

SILVA, G. M. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse using SSF process and thermotolerant yeast. **Transactions of ASABE**, v. 58(2), 2015.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SILVA, V. F. N. **Estudos de Pré-tratamento e Sacarificação Enzimática de Resíduos Agroindustriais como Etapas no Processo de Obtenção de Etanol Celulósico**. 116 p. Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Departamento de Biotecnologia, 2009.

SIVERS, M.V.; ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 43-52, 1995.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications**. 2. Ed. California, USA: Academic Press. 1992.

SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. Chemical Composition of Wood and Pulps: Basic Constituents and Their Distribution. In: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. **Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking**. Berlin: Springer-Verlag, 1999.

SLUITER, A. et al. **Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples**. Technical report NREL/TP-510-42623. Golden, Colorado. National Renewable Energy Laboratory, 2008.

SMEETS, S. et al. Contribution of N₂O to the greenhouse gas balance of first generation biofuels. **Global Change Biology**, 15:1-23, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 3, p. 1-11, 2002.

SUN, Y.; CHENG, J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, V. 96, p. 1599-1606, 2005.

SUN, R. C.; TOMKINSON, J. Fractional separation and physico-chemical analysis of lignins from the black liquor of oil palm trunk fiber pulping. **Separation and Purification Technology**, v. 4, p. 529-539, 2001.

SURYAWATI, L. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass pretreated by hydrothermolysis using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. **Biotechnology Bioengineering**, v. 101, n. 5, p. 894-902, 2008.

SURYAWATI, L. et al. effect of hydrothermal process conditions on pretreated switchgrass composition and ethanol yield by SSF with *Kluyveromyces marxianus* IMB4. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 540-545, 2009.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Science**, v. 9, p. 1621-1652, 2008.

TRAJANO, H. L. et al. The fate of lignin during hydrothermal pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, 6:110, 2013.

TIMELL, T. E. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. **Wood Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 45-70, 1967.

TORTOSA, J. F.; RUBIO, M.; DEMETRIO, G. Autohidrólisis de tallo de maíz em suspensão acuosa. **Afinidad**, 52:181-188, 1995.

TRIVELLIN, P. C. O.; VICTORIA, R. L.; RODRIGUEZ, J. C. S. Utilization by late harvest sugar cane ratoon of nitrogen from ¹⁵n-aqua ammonia and ¹⁵n-urea applied to the soil as vinasse n-complement. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 30:1375-1385, 1995.

TYNER, W. E.; TAHERIPOR, F.; PERKIS, D. Comparison of fixed versus variable biofuels incentives. **Energy Policy**, 38:5530-5540, 2010.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, 330:219-222, 2010.

VAAJE-KOLSTAD, G. et al. Characterization of the chitinolytic machinery of *Enterococcus faecalis* V583 and high resolution structure of its oxidative CBM33 enzyme. **Journal of Molecular Biology**, 416:239-254, 2012.

Van der WALT, J. P. *Kluyveromyces van der Walt* emend. Van der Walt. In: Lodder J (ed) the yeast: a taxonomic study, 2n ed, **NHPC**, Amsterdam, p. 316-378, 1970.

VARGAS G. J.; PEREIRA N. Sugar cane bagasse as feedstocks for second generation ethanol production. **Electronic Journal of Biotechnology**, Doi: 10.2225/vol13-issue5-fulltext-8, 2010.

VIAMAJALA, S. et al. Heat and mass transport in processing of lignocellulosic biomass for fuels and chemicals. In **Sustainable Biotechnology**. Edited by Singh OV, Harvey SP. Netherlands: springer, 1:18, 2010.

VISSER, E. M. et al. Increase enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. **Biotechnology for Biofuels**, 8:5, 2015.

VITTI, A. C. et al. Nitrogen derived from fertilization and straw for plant cane nutrition. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46:287-293, 2011.

WANDERLEY, M. C. A. et al. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, 128:448-453, 2013.

WANG, Q. Q. et al. Evaluations of cellulose accessibilities of lignocelluloses by solute exclusion and protein adsorption techniques. **Biotechnology and Bioengineering**, 109:381-389, 2011.

WALCH, E. et al. Enzymatic saccharification of hemicellulose obtained from hydrothermally pretreated sugar cane bagasse and beech bark. **Bioresource Technology**, v. 39, n. 2, p. 173-177, 1992.

WHISTLER, R. L.; RICHARDS, E. L. Hemicelluloses. In: PIGMAN W.; HORTON D. (Eds.). **The carbohydrates, Chemistry and Biochemistry**. New York: Academic, v. IIA, p. 447-469, 1970.

WINGREN A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Technoeconomic evaluation from wasted crops and ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnology Progress**, 19:1109-1117, 2003.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 1, p. 88-95, 2004.

YANG, B.; WYMAN, C.E. Characterization of the degree of polymerization of xylooligomers produced by flowthrough hydrolysis of pure xylan and corn stover with water. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5756-5762, 2008.

YANG, B.; WYMAN, C.E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2:26-40, 2008.

YU, G. et al. Pretreatment of rice straw by a hot-compressed water process for enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 539-551, 2010.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance, Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 6:465-482, 2012.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance, Part II: fundamentals of different pretreatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 6:561-579, 2012.

7. PUBLICAÇÃO

SILVA, G. M., GIORDANO, R. L. C., CRUZ, A. J. G., RAMACHANDRIYA, K. D., BANAT, I. M., WILKINS, M. R. **Ethanol production from sugarcane bagasse using SSF process and thermotolerant yeast.** Transactions of the ASABE, v. 58(2), 2015.