

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

MARIA CLARA SERTORI

**COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G
POR BIOPROCESSAMENTO CONSOLIDADO A
PARTIR DE BAGAÇO E PALHA DA CANA**

SÃO CARLOS -SP
2025

MARIA CLARA SERTORI

**COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G POR BIOPROCESSAMENTO
CONSOLIDADO A PARTIR DE BAGAÇO E PALHA DA CANA**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thais Suzane Milessi Esteves

São Carlos-SP
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Engenharia Química

Folha de aprovação

Prof^a. Dr^a. Thais Suzane Milessi Esteves
Universidade Federal de São Carlos

Prof^a. Dr^a. Fernanda Casciatori
Universidade Federal de São Carlos

Me. Marcio Daniel Nicodemos Ramos
Universidade Federal de São Carlos

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Laercio (*in memoriam*),
Minha mãe, Fátima
Meus irmãos, Tiago, Natália, Sara e Miguel
E meu namorado, Víctor

AGRADECIMENTO

Ao meu pai, Laercio (*in memoriam*), por me levar e me buscar todos os dias no laboratório, mesmo que fosse tarde, por me levar marmitas durante o período dos experimentos e por todo apoio e incentivo.

À minha mãe, Fatima, por todo carinho e preocupação, por estar sempre do meu lado e me incentivar em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Tiago, Natália, Sara e Miguel, por serem tão especiais e apoiarem e celebrarem as minhas conquistas.

Ao meu namorado, Victor, por ser meu porto seguro e estar ao meu lado em todos os momentos, e me dar forças todos os dias.

À professora Dra. Tereza Cristina Zangirolami, por me receber em seu grupo de pesquisa, me orientar nos primeiros passos e me auxiliar quando necessário.

À professora Dra. Thais Millessi, por ter sido minha orientadora neste trabalho, por me ensinar e me guiar, por toda paciência e todos os momentos divididos no laboratório.

Ao Márcio e à Juliana, meus companheiros de laboratório, por me ensinarem os procedimentos, me auxiliarem no tratamento de dados e pela amizade durante toda a pesquisa.

Aos meus amigos da faculdade, por todos os momentos e desafios divididos durante todo o período do curso, e em especial, à minha amiga Francine, minha maior companheira nesta trajetória, por cada momento difícil e por estar presente em cada uma das conquistas.

Ao laboratórios LaDaBio, LAFAC e LaBioS, por toda infraestrutura e disponibilidade oferecida durante a realização dos experimentos.

À UFSCar e ao DEQ, por todo incentivo e infraestrutura oferecidos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), por todo suporte financeiro oferecido ao grupo de pesquisa.

RESUMO

Diante do cenário atual marcado pela dominância do uso de combustíveis fósseis, a busca por fontes de energias renováveis com alta eficiência cresce cada vez mais. Uma alternativa é o melhor aproveitamento dos materiais lignocelulósicos da cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração (2G). Um dos desafios deste processo, é a hidrólise eficiente da biomassa devido ao alto custo das enzimas hidrolíticas, à estrutura complexa da biomassa e ao fato de parte das enzimas celulolíticas adsorverem na lignina contida em sua estrutura, de forma que o tipo de biomassa utilizada pode interferir na eficiência desse processo. O Bioprocessamento Consolidado (BPC), por sua vez, se destaca como uma técnica onde a produção de enzimas, a hidrólise da biomassa e a fermentação de açúcares acontecem simultaneamente em um único biorreator pelo uso de microrganismos recombinantes. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o BPC de diferentes biomassas (bagaço e palha de cana), assim como diferentes estratégias para melhorar a eficiência da etapa de hidrólise e conseqüentemente a produção de etanol. Para isso, a levedura geneticamente modificada *Saccharomyces cerevisiae* AC14, que secreta sete enzimas hidrolíticas, foi utilizada no BPC da palha e do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados hidrotermicamente, ambos submetidos ao congelamento para melhorar o acesso das enzimas à biomassa ou à adição de proteína de soja como estratégia para contornar a adsorção das enzimas, atuando como moléculas de sacrifício. O tempo de duração dos cultivos foi de 12 horas, e para avaliar os resultados foram feitas análises de viabilidade das leveduras, densidade óptica (DO), pH do meio, atividade enzimática e quantificação de substratos e produtos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). De maneira geral os ensaios com ambas as biomassas apresentaram performance semelhante, com produtividades em torno de 1,2 g/L/h. O congelamento favoreceu os cultivos utilizando ambas biomassas, porém a adição de proteína de soja favoreceu apenas os cultivos com palha, mostrando a influencia do tipo de biomassa no processo. Assim, o BPC representa uma alternativa interessante para a produção de etanol 2G, e o congelamento e a adição de proteína de soja são métodos atrativos para aumentar a eficiência dos cultivos.

Palavras-chave: etanol 2G; bagaço de cana-de-açúcar; palha de cana-de-açúcar; bioprocessamento consolidado; fermentação.

ABSTRACT

Given the current scenario marked by the dominance of fossil fuels, the search for highly efficient renewable energy sources is growing more and more. One alternative is to make better use of lignocellulosic materials from sugarcane to produce second-generation ethanol (2G). One of the challenges of this process is the efficient hydrolysis of biomass due to the high cost of hydrolytic enzymes, the complex structure of biomass and the fact that some of the cellulolytic enzymes adsorb onto the lignin contained in its structure, so that the type of biomass used can interfere with the efficiency of this process. Consolidated Bioprocessing (BPC), in turn, stands out as a technique in which enzyme production, biomass hydrolysis and sugar fermentation occur simultaneously in a single bioreactor using recombinant microorganisms. In this sense, the present study aimed to evaluate the BPC of different biomasses (bagasse and sugarcane straw), as well as different strategies to improve the efficiency of the hydrolysis stage and consequently the production of ethanol. For this purpose, the genetically modified yeast *Saccharomyces cerevisiae* AC14, which secretes seven hydrolytic enzymes, was used in the BPC of sugarcane straw and bagasse pretreated hydrothermally, both subjected to freezing to improve the access of enzymes to the biomass or to the addition of soy protein as a strategy to bypass the adsorption of the enzymes. The cultivation time was 12 hours, and to evaluate the results, analyses of yeast viability, optical density (OD), pH of the medium, enzymatic activity and quantification of substrates and products by high-performance liquid chromatography (HPLC) were performed. In general, the tests with both biomasses presented similar performance, with productivities around 1.2 g/L/h. Freezing favored crops using both biomasses, but the addition of soy protein favored only crops with straw, showing the influence of the type of biomass in the process. Thus, BPC represents an interesting alternative for the production of 2G ethanol, and freezing and the addition of soy protein are attractive methods to increase crop efficiency.

Keyword: 2G ethanol; sugarcane bagasse; sugarcane straw; consolidated bioprocessing; fermentation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas da produção de Etanol 2G.....	19
Figura 2 - Estrutura lignocelulósica da biomassa.....	20
Figura 3 – Bioprocessamento Consolidado para obtenção de etanol 2G.....	25
Figura 4 - Conversão de açúcares do bagaço em etanol em função do tempo.....	35
Figura 5 - Atividades enzimáticas em função do tempo para os cultivos BPC com bagaço.....	36
Figura 6 - Conversão de açúcares da palha em etanol em função do tempo.....	38
Figura 7 - Atividades enzimáticas em função do tempo para os cultivos BPC com palha.....	39
Figura 8 – Incrementos em porcentagem em relação à condição padrão das atividades enzimáticas secretadas nos cultivos BPC para a bagaço e para a palha...	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Enzimas secretadas pela levedura AC14 e seus respectivos genes, organismos de origem, pH e temperatura ótima de atuação.....	26
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos hidrolisados resultantes dos pré-tratamentos ácido e hidrotérmico do bagaço e da palha de cana-de-açúcar.....	33
Tabela 2 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos obtidos para os cultivos com bagaço.....	36
Tabela 3 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos obtidos para os cultivos com palha.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G: Primeira geração

2G: Segunda geração

AC14: Levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada

AE: Atividade enzimática

BPC: Bioprocessamento Consolidado

CMC: Carboximetilcelulose

C_x: Concentração de células

D: Dextrose

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DO: Densidade Óptica

EtOH: Etanol

HMF: 5-hidroximetilfurfural

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

NR: Não reportado

P: Peptona

p-NPX: 4-nitrofenil β-D-xilopiranosídeo

SHF: Hidrólise e fermentação separadas

SSF: Sacarificação e fermentação simultâneas

SSCF: Sacarificação e co-fermentação simultâneas

X: Conversão

Y: Extrato de levedura

YPDX: meio composto por extrato de levedura, peptona, dextrose e xilose

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Objetivos	15
3. Revisão bibliográfica	15
3.1. Sustentabilidade.....	15
3.2. Biomassa lignocelulósica.....	16
3.3. Pré-tratamento.....	18
3.4. Hidrólise enzimática.....	20
3.5. Bioprocessamento Consolidado (BPC).....	21
4. Materiais e métodos	23
4.1. Microrganismo e inóculo.....	23
4.2. Pré-tratamento da biomassa.....	24
4.3. Ensaio BPC.....	25
4.3.1. Ensaio com bagaço de cana-de-açúcar.....	25
4.3.2. Ensaio com palha de cana-de-açúcar.....	26
4.4. Métodos Analíticos.....	26
4.5. Cálculos.....	29
5. Resultados e Discussão	30
5.1. Pré-tratamento do bagaço e da palha de cana-de-açúcar.....	30
5.2. Ensaio BPC com bagaço de cana-de-açúcar.....	31
5.3. Ensaio BPC com palha de cana-de-açúcar.....	34
5.4. Análise comparativa.....	37
6. Considerações Finais	39
Referências	40

1 INTRODUÇÃO

Diante do panorama atual do uso de energia marcado pela dominância de fontes de combustíveis fósseis, assuntos relacionados ao conceito de sustentabilidade vêm ganhando cada vez mais destaque no mercado (ADITIYA *et al.*, 2016). Com efeito, os biocombustíveis se apresentam como uma solução bastante promissora na tentativa de reduzir o uso de fontes não renováveis, responsáveis pela alta emissão de gases de efeito estufa (FURLAN *et al.*, 2013).

Neste sentido, muitos esforços vêm sendo realizados com o intuito de desenvolver processos mais eficientes, sustentáveis e econômicos. O etanol 2G tem ganhado cada vez mais destaque, uma vez que possibilita o aumento da produção de biocombustível sem demandar mais área plantada (WASYLENKO; STEPHANOPOULOS, 2015). Isso é possível uma vez que nesse processo são utilizados subprodutos agroindustriais, principalmente os que não são fonte de alimentos (OCTAVE e THOMAS, 2009).

Os materiais lignocelulósicos, como bagaço e palha de cana, constituem uma abundante fonte de matéria-prima no contexto da Biorrefinaria para obtenção de etanol 2G e outros compostos, além de ser um substrato interessante por permitir o aumento da produção do etanol sem demandar maior área de plantio (CAMARGO *et al.*, 2019). Estes materiais são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, representando uma fonte de carbono interessante em bioprocessos uma vez que celulose e hemicelulose são majoritariamente compostas por açúcares fermentescíveis e correspondem a até 70% da biomassa (SHARMA *et al.*, 2020; AGUIAR *et al.*, 2021).

Porém, os componentes da biomassa se dispõem de forma a tornar a biomassa recalcitrante. Para produção de etanol 2G, a estrutura complexa da biomassa deve ser rompida a fim de tornar as frações celulósica e hemicelulósica mais acessíveis à ação de enzimas hidrolíticas, viabilizando a liberação dos açúcares e sua fermentação a etanol. Diante disso, uma etapa de pré-tratamento deve ser aplicada, a qual pode consistir em processos físicos, químicos, físico-químicos, biológicos ou uma combinação desses processos (SHARMA *et al.*, 2020; AGUIAR *et al.*, 2021). Após o pré-tratamento da biomassa, geralmente são geradas uma fração líquida rica em hemicelulose solubilizada, e uma fração sólida contendo principalmente celulose e lignina (celulignina) (AGUIAR *et al.*, 2021). Para que os

açúcares presentes na celulignina sejam liberados, uma etapa de hidrólise enzimática utilizando enzimas celulolíticas é necessária. Todavia, o elevado custo das enzimas ainda é um obstáculo para sua aplicação em larga escala (KUMAR e SHARMA, 2017; BARUAH *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018). Outro desafio consiste na adsorção das enzimas na lignina residual, e para eliminar este problema, podem ser adicionadas moléculas de sacrifício, que seriam adsorvidas no lugar das enzimas. Uma opção com bastante potencial é a proteína de soja (FLORENCIO *et al.*, 2016).

Neste contexto, o Bioprocessamento Consolidado (BPC) da biomassa surge como uma tecnologia emergente bastante promissora, na qual a produção de enzimas, a hidrólise da biomassa e a fermentação dos açúcares liberados ocorrem simultaneamente em um único reator, dispensando o uso de coquetéis enzimáticos comerciais (PEREZ *et al.*, 2023). Nesta tecnologia, utiliza-se um microrganismo ou um consórcio de microrganismos que apresentem tanto a capacidade de secreção de enzimas hidrolíticas quanto de fermentação dos açúcares liberados (JIN, 2000; OLGUIN-MACIEL *et al.*, 2020). Porém, infelizmente ainda não foi encontrado um microrganismo selvagem capaz de produzir enzimas e etanol eficientemente (OLGUIN-MACIEL *et al.*, 2020), incentivando o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados providos dessa capacidade. Adicionalmente, um dos desafios nessa busca consiste na dificuldade de encontrar micro-organismos capazes de realizar a fermentação eficiente de pentoses, tendo em vista que a *Saccharomyces cerevisiae* selvagem não atende essa necessidade (MUSSATTO *et al.*, 2012).

Dentre as leveduras recombinantes descritas na literatura, a cepa *S. cerevisiae* AC14, construída por Claes *et al.*, (2020), se destaca por ser capaz de secretar 7 enzimas envolvidas na degradação da biomassa, além de consumir eficientemente xilose. Esse microrganismo foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Johan M. Thevelein (NovelYeastbv/Bélgica) e gentilmente cedido para ser avaliado no presente trabalho.

Considerando que a “Engenharia do Bioprocessamento Consolidado” é pouco estudada na literatura, na qual são encontrados principalmente trabalhos cujo foco é a construção da cepa (DEMEKE *et al.*, 2013; LIAO *et al.*, 2020; CLAES *et al.*, 2020), o presente trabalho buscou contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de produção de etanol 2G a partir do BPC de bagaço e a palha da cana-de-açúcar utilizando a levedura recombinante AC14, identificando a influência da biomassa utilizada no processo.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi realizar o Bioprocessamento Consolidado de dois tipos de biomassas oriundas do processamento da cana, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, bem como realizar uma análise comparativa entre eles, contribuindo para o estabelecimento de uma tecnologia para a obtenção de etanol 2G.

Objetivos específicos:

- Avaliar o aproveitamento de subprodutos da indústria sucroenergética, utilizando o bagaço e a palha da cana-de-açúcar como substrato para BPC;
- Avaliar o desempenho do BPC com relação à adição da proteína de soja no meio fermentativo;
- Avaliar a realização de um pré-tratamento complementar (congelamento) no desempenho do BPC;
- Realizar uma análise comparativa entre o BPC utilizando bagaço e palha de cana, a fim de identificar a influência da biomassa no processo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Sustentabilidade

Diante do cenário da busca pelo desenvolvimento de energias mais sustentáveis, os biocombustíveis têm ganhado bastante destaque, uma vez que são provenientes de matéria orgânica, como produtos vegetais ou compostos de origem animal. As fontes mais utilizadas mundialmente são o milho e a cana-de-açúcar (DA SILVA *et al.*, 2012). Além de constituírem uma opção renovável de energia, são biodegradáveis, contribuindo para a redução de problemas ambientais (ORTENZIO *et al.*, 2015).

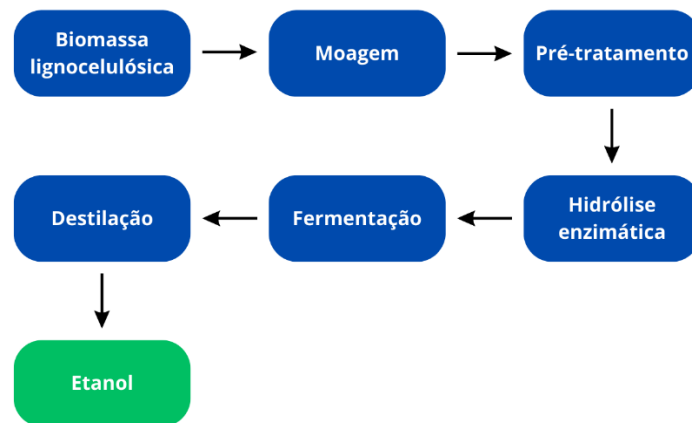
Diante disso, o conceito de biorrefinaria se mostra como um importante aliado na busca pela sustentabilidade, uma vez que seu intuito é a redução do uso de combustíveis fósseis, a partir de conversão de grandes quantidades de biomassa vegetal em combustíveis. Nas biorrefinarias os principais componentes da biomassa, que constituem a celulose, hemicelulose e lignina, são convertidos em materiais de alto valor agregado (USMANI *et al.*, 2021).

Neste sentido, o etanol de 2G se destaca como uma alternativa com grande potencial, tendo em vista que é obtido a partir de subprodutos agroindustriais de baixo valor agregado, que não concorrem com a produção de alimentos (SHARMA *et al.*,

2018) de forma a aumentar a produção de etanol sem a necessidade de aumentar a área plantada (LOPES *et al.*, 2017). O material escolhido para a produção de etanol 2G varia de acordo com a disponibilidade de cada período e região e, uma vez que o Brasil apresenta alta acessibilidade à cana-de-açúcar, o bagaço e a palha da cana são escolhas mais viáveis no cenário brasileiro.

O processo de produção de etanol 2G envolve algumas etapas principais, que constituem o pré-tratamento da biomassa, a hidrólise das frações celulósicas e hemicelulósicas, a fermentação dos açúcares, e a posterior recuperação do etanol (PEREZ *et al.*, 2021), conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1. Etapas da produção de Etanol 2G.



Fonte: Adaptado de RAMOS, 2023.

A partir da etapa de pré-tratamento, ocorre a separação dos principais componentes da biomassa vegetal, bem como a exposição das fibras envolvidas pela lignina, e a modificação da estrutura a monômeros que são fermentescíveis. A desconstrução da biomassa constitui a principal diferença entre o Etanol 1G e o 2G, tendo em vista que é essencial a hidrólise das macromoléculas para a realização da fermentação posteriormente (SANDRI *et al.*, 2021).

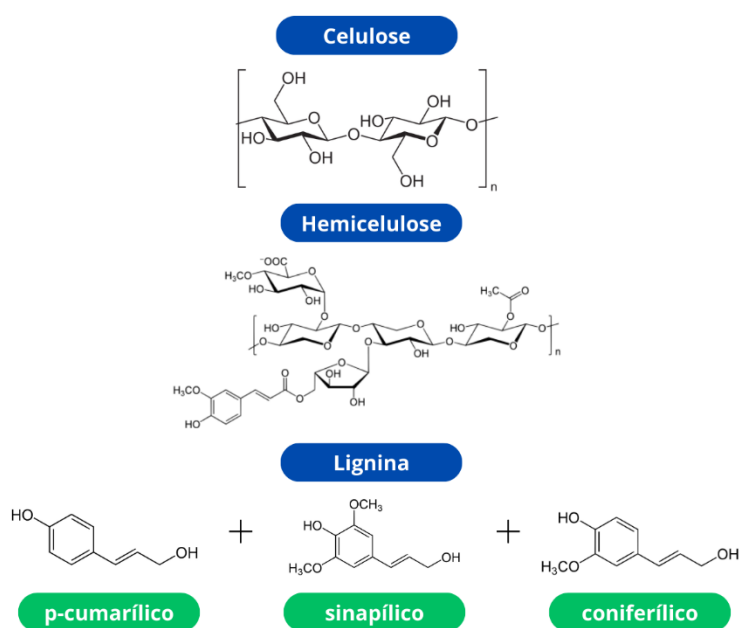
3.2 Biomassa lignocelulósica

No Brasil, a principal cultura agrícola cultivada é a cana-de-açúcar, sendo que o país é o maior produtor de cana do mundo, tendo produzido em 2024 mais de 700 milhões de toneladas (CONAB, 2024).

O bagaço da cana-de-açúcar consiste no resíduo do caule da cana após a moagem, e a palha corresponde à parte das folhas remanescentes após a colheita, com uma geração de aproximadamente 140 kg de bagaço e 120 kg de palha por tonelada de cana processada nas usinas (CANILHA *et al.*, 2012). Atualmente o aproveitamento do bagaço é realizado na cogeração de energia nas usinas, porém, o equilíbrio entre a quantidade de bagaço queimado e utilizado para a produção de etanol 2G pode ser determinado por ferramentas de análise técnico e econômica (ELIAS *et al.*, 2021). A palha de cana, por sua vez, vem ganhando visibilidade apenas recentemente devido à substituição da colheita manual pela colheita mecanizada da cana, de forma que a palha deixou de ser queimada e passou a ser um novo subproduto da cadeia produtiva das usinas (AGUIAR *et al.*, 2021).

O bagaço e a palha de cana são materiais lignocelulósicos, compostos majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, cujas estruturas estão representadas na Figura 2.

Figura 2. Estrutura lignocelulósica da biomassa.



Fonte: Autoria própria.

A celulose é constituída por unidades de glicose unidas por ligações β ,1-4. Sua estrutura é enrijecida devido às ligações de hidrogênio formadas por seus filamentos, que a tornam insolúvel em água e solventes orgânicos (MISCHNICK; MOMCILOVIC,

2010). A hemicelulose é composta por uma mistura de hexoses, pentoses e ácidos, sendo as principais a xilana, glucomanana e galactana. A sua estrutura é ramificada e amorfa, o que facilita o processo de hidrólise, devido às ligações menos estáveis (LI *et al.*, 2010). Por fim, a lignina consiste em uma macromolécula complexa, que confere rigidez ao conjunto, envolvendo a celulose, de forma a limitar o acesso das enzimas (CANILHA *et al.*, 2011). É composta por três álcoois, álcool cumarílico, álcool sinapílico e álcool coniferílico. Possui alto peso molecular e está ligada à celulose e à hemicelulose por meio de ligações covalentes e hidrogenadas (CORRÊA e GALLO, 2020).

A composição do bagaço consiste em aproximadamente 40% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (CANILHA *et al.*, 2012), enquanto que a da palha consiste em 35% de celulose, 25% de hemicelulose e 20% de lignina (Pratto *et al.*, 2016).

3.3 Pré-tratamento

A etapa de pré-tratamento é fundamental para reduzir a recalcitrância da estrutura da biomassa e expor os componentes celulósicos e hemicelulósicos a ação de enzimas hidrolíticas para liberação dos açúcares fermentescíveis. Com efeito, existem diferentes métodos para a realização desse processo, como por exemplo, tratamentos físicos, químicos, biológicos, ou uma mistura deles (YAMAKAWA *et al.*, 2018).

O pré-tratamento hidrotérmico se destaca pela sua simplicidade, economia e por ser sustentável, uma vez que gera uma quantidade muito baixa de resíduos (CHEAH *et al.*, 2020). Neste processo, ocorre a auto-hidrólise das ligações em presença do íon hidroxônio [H₃O⁺], uma vez que a constante dielétrica da água permite a dissolução dos compostos orgânicos, enquanto a elevada constante de ionização proporciona um meio ácido, resultando na hidrólise da biomassa pela quebra das ligações éster e éter. Além disso, o ácido acético liberado a partir das cadeias laterais da hemicelulose também age como catalisador no processo (SANDRI, 2021). Após o pré-tratamento, são obtidas duas fases distintas: uma fração sólida rica em celulose e uma fase líquida solúvel rica em hemicelulose (CARVALHO *et al.*, 2013).

As vantagens envolvem alto rendimento em recuperação e solubilização da

fração hemicelulósica, bem como o fato de não precisar de adição de solventes e ácidos ou reatores resistentes à corrosão (YUE *et al.*, 2022). Além disso, o processo mantém a celulose na fração sólida, o que facilita a etapa seguinte de hidrólise enzimática (MILESSI, 2017). As desvantagens estão relacionadas ao alto uso de água para a realização do processo (CHEAH *et al.*, 2020) e à dificuldade na obtenção de xilose livre, uma vez que a fração hemicelulósica solubilizada se encontra na forma de xilooligômeros (BEZERRA; RAGAUSKAS, 2016; MILESSI, 2017; ZABED *et al.*, 2016).

O pré-tratamento ácido consiste na solubilização das hemiceluloses em monômeros fermentescíveis, a partir de uma reação com ácido, embora as frações de celulose e lignina não sejam tão alteradas (MOSIER *et al.*, 2005). Este processo pode ser realizado com ácido diluído em condições de temperaturas altas, acima de 100°C, ou com ácido concentrado, em condições mais amenas, abaixo de 100°C (BARUAH *et al.*, 2018). Neste sentido, processos com ácidos diluídos são mais atrativos, uma vez que desgastam menos os equipamentos e sua neutralização é mais simples, além de gerar menos resíduos (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

As desvantagens deste processo estão relacionadas à possibilidade de degradação dos monômeros, como xilose e glicose, que produzem inibidores do crescimento microbiano, como HMF e furfural, prejudicando a etapa posterior de fermentação (TIZAZU; MOHOLKAR, 2018). Além disso, parte da lignina também se solubiliza, produzindo compostos fenólicos e aromáticos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

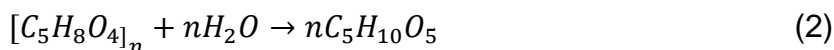
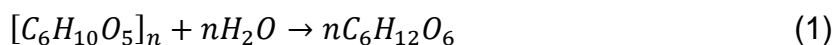
Embora os pré-tratamentos hidrotérmico e ácido contribuam para a redução da rigidez da estrutura da biomassa, ainda pode ser necessário um tratamento adicional, para facilitar a atuação das enzimas. Os tratamentos físicos apresentam custo mais baixo, comparado aos químicos e biológicos (REMPEL *et al.*, 2018).

Neste sentido, existem técnicas como o tratamento por micro-ondas, que gera um aquecimento das moléculas de água presentes na estrutura da biomassa, por meio de um intenso movimento rotacional (SANSEVERINO, 2002). Outra técnica utilizada para este fim consiste no pré-tratamento por ultrassom, no qual a irradiação leva ao rompimento da parede celular da fibra (LIU *et al.*, 2007). Além disso, o congelamento se destaca devido à sua eficiência. Neste processo, a baixa temperatura promove a formação de cristais de gelo, que fazem com que a água expanda e rompa as paredes celulares, de forma a aumentar a área superficial de

exposição da biomassa (CHANG *et al.*, 2011).

3.4 Hidrólise enzimática

O conceito de hidrólise enzimática se refere à uma reação química de quebra de ligações realizada sob a ação de uma enzima, na presença de água. Após a realização dos pré-tratamentos, parte da biomassa ainda se encontra na forma de carboidratos complexos, e a hidrólise enzimática é aplicada para auxiliar na conversão total em monômeros (SANDRI *et al.*, 2021). As Equações (1) e (2), representam as reações de hidrólise para a celulose e hemicelulose, respectivamente.



Esse método é vantajoso devido à alta conversão, em função da especificidade das enzimas, além de não gerar resíduos tóxicos e ser economicamente atrativo, em virtude de condições mais amenas de processo, como baixa pressão e temperatura (RAMOS *et al.*, 2023).

As enzimas que realizam a hidrólise da celulose são as celulases, enquanto que as que realizam a hidrólise da hemicelulose são as hemicelulases. As celulases são um conjunto de enzimas que agem sinergisticamente: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidades, cujo pH ótimo de atuação é em torno de 4,5 a 5,0 (BINOD *et al.*, 2011). As endoglucanases atuam na clivagem das ligações mais internas da cadeia, enquanto as exoglucanases atuam nas ligações mais externas e as β -glicosidades convertem celobiose em glicose (SINGH, 2017). Com efeito, as hemicelulases mais utilizadas são as endoxilanases e as β -xilosidases, que atuam na hidrólise das xilanas, sendo que a endoxilanase atua no meio da cadeia e a β -xilosidase converte xilobiose em xilose (MILESSI, 2017; BHARDWAJ *et al.*, 2019).

Um desafio observado nesta etapa consiste na adsorção das enzimas na lignina da biomassa, uma vez que esse processo é irreversível, causando perda de eficiência significativa na hidrólise. Deste modo, uma alternativa promissora é a adição de proteínas no meio fermentativo, tendo em vista que elas atuam como moléculas de sacrifício, e são adsorvidas no lugar das enzimas. Diante disso, a

proteína de soja destaca-se como uma possibilidade eficiente e de baixo custo (FLORENCIO *et al.*, 2019).

Existem algumas configurações de processo que podem ser adotadas para a realização da hidrólise no processamento da biomassa, de acordo com o objetivo desejado. Uma delas consiste na Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF, do inglês “Separated Hydrolysis and Fermentation”), na qual cada etapa é realizada separadamente, em pH e temperaturas ideais das enzimas e microrganismos envolvidos, porém, a inibição das celulases pela glicose gerada na etapa de hidrólise pode ser um desafio para esta conformação. Outra possível configuração consiste na Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF, do inglês “Simultaneous Saccharification and Fermentation”), na qual enzimas e leveduras são adicionadas em um único reator, porém a atividade das enzimas hidrolíticas é menor, devido à diferença de temperatura do ponto ótimo de atuação, que para as enzimas é de 45 a 50 °C, enquanto a fermentação deve ser realizada entre 30 e 35 °C por conta da presença das leveduras (DIAZ *et al.*, 2014). Por fim, outra possível configuração consiste na Sacarificação e Co-Fermentação Simultâneas (SSCF, do inglês “Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation”), no qual além de realizar-se as duas etapas num mesmo biorreator, é utilizado um microrganismo capaz de fermentar hexoses e pentoses (MORALES-RODRIGUEZ *et al.*, 2011). Mais recentemente, surgiu o Bioprocessamento Consolidado da biomassa, onde as etapas de produção das enzimas, hidrólise e fermentação ocorrem num único reator (PARISUTHAM *et al.*, 2014), e que representa importante avanço no processamento da biomassa e desenvolvimento de biorrefinarias.

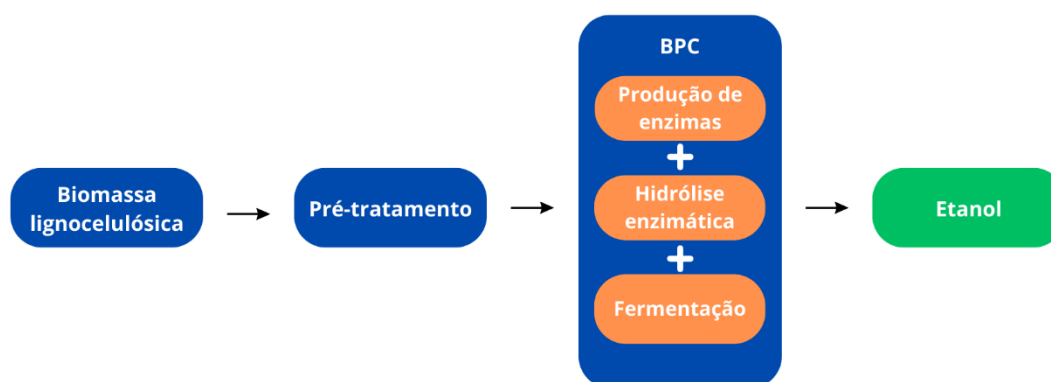
3.5 Bioprocessamento Consolidado (BPC)

O Bioprocessamento Consolidado (BPC) consiste em uma tecnologia na qual a produção de enzimas, a hidrólise da biomassa e a fermentação dos açúcares acontecem simultaneamente em um único biorreator (PARISUTHAM *et al.*, 2014), conforme apresentado na Figura 3. No BPC são utilizados microrganismos capazes de produzir enzimas hidrolíticas e fermentar os açúcares liberados em produto de interesse, não necessitando da adição de enzimas comerciais. Com efeito, essa é a grande vantagem deste método, uma vez que o alto custo da produção de Etanol 2G está associado ao uso de coquetéis enzimáticos (RAMOS, 2023). Além disso, o BPC

apresenta outras vantagens relacionadas ao uso de reatores com tamanhos menores, associados à um menor consumo de energia, bem como ao menor risco de contaminação (OLGUIN-MACIEL *et al.*, 2020).

Em contrapartida, a maior desvantagem do BPC está relacionada à dificuldade do processo em atingir seu ponto ótimo em todas as etapas, tendo em vista que as condições ideais de temperatura e pressão para a etapa de hidrólise não correspondem às mesmas para a fermentação. Dessa forma, o processo não acontece da forma mais eficiente, necessitando de otimização para ser viável (PEREZ, 2021).

Figura 3. Bioprocessamento Consolidado para obtenção de etanol 2G.



Fonte: Adaptado de RAMOS *et al.*, 2022.

Para o desenvolvimento de um BPC eficiente, é possível perceber a importância dos avanços na área de Engenharia Genética, uma vez que microrganismos recombinantes apresentam grande potencial no aumento de produtividade para a produção de Etanol 2G. Com efeito, Claes e colaboradores (2020), produziram uma levedura recombinante, denominada AC14, que é uma *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de secretar sete enzimas hidrolíticas, conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1. Enzimas secretadas pela levedura AC14 e seus respectivos genes, organismos de origem, pH e temperatura ótima de atuação.

Enzima	Gene	Organismo	pH	Temperatura (°C)
β -glicosidase	<i>bgl1</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	4,6	65
β -xilosidase	<i>xlnD</i>	<i>Aspergillus niger</i>	3,2	60
Xilanase	<i>xlnB</i>	<i>Aspergillus niger</i>	5,0	50
Endoglucanase	<i>celB</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,0	45
Celobiohidrolase I	<i>cbh2b</i>	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	NR	NR
Celobiohidrolase II	<i>cbh1</i>	<i>Talaromyces emersonii</i>	5,0	55
Acetil-xilana esterase	<i>xynA</i>	<i>Clostridium cellulovorans</i>	5,0	60

NR*: Não reportado.

Fonte: Adaptado de Claes et al., 2020.

Essa levedura foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa liderado pelo professor Johan Thevelein (NovelYeast/Bélgica) e se destaca por apresentar resultados promissores em meios industriais. Em 2023, Perez e colaboradores estudaram a produção de Etanol 2G com a AC14 e observaram a produção de 26,8 g/L de etanol em 6 horas de fermentação, totalizando uma produtividade de 4,5 g/L/h em meio sintético composto por glicose, xilose, celbiose, xilana de sabugo de milho e CMC. Já em bagaço de cana pré-tratado hidrotérmicamente, os autores obtiveram 13 g/L de etanol em 7 horas (1,86 g/L/h), resultados superiores aos relatados na literatura até então, que ficam na faixa de 0,15 g/L/h (CUNHA *et al.*, 2020) e 0,01 g/L/h (AMOAH *et al.*, 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo e inóculo

O bagaço e a palha de cana-de-açúcar utilizados foram doados pela usina do Ipiranga, localizada na cidade de Descalvado, interior de São Paulo. Em todos os experimentos foi utilizada a levedura geneticamente modificada *Saccharomyces cerevisiae* AC14, gentilmente cedida pelo Prof. Johan Thevelein (NovelYeastbv/Bélgica) (CLAES *et al.*, 2020). Essa levedura é capaz de assimilar glicose, xilose e outras hexoses, e secreta sete enzimas hidrolíticas: β -glicosidase (EC 3.2.1.21), β -xilosidase (EC 3.2.1.37), acetil-xilana esterase (EC 3.1.1.72), xilanase (EC 3.2.1.8), endoglucanase (3.2.1.4), celbiohidrolase I e II (EC 3.2.1.91).

Inicialmente, uma amostra da levedura AC14 foi retirada do ultrafreezer, onde estava armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, e foi estriada em uma placa de Petri, que continha um meio sólido YPágar composto por extrato de levedura (10 g/L), peptona (20 g/L), dextrose (20 g/L), xilose (20 g/L), carboximetilcelulose (5 g/L), xilana (10 g/L), celobiose (10 g/L) e ágar (15 g/L). A placa foi levada à incubadora a 30°C por 48 horas. Após esse período, uma das colônias formadas foi ressuspensa em 75 μL de água destilada estéril, e com o auxílio de uma alça de Drigalski, a suspensão foi espalhada em uma nova placa de Petri YPágar, contendo extrato de levedura (10 g/L), peptona (20 g/L), dextrose (20 g/L), xilose (20 g/L) e ágar (15 g/L), para a formação de um “tapete” de células, e esta nova placa foi levada à incubadora a 30°C , por 24 horas.

Em seguida, o “tapete” de células foi totalmente ressuspensa em meio líquido YPDX, composto por extrato de levedura (10 g/L), peptona (20 g/L), dextrose (20 g/L) e xilose (20 g/L), e inoculado em um Erlenmeyer aletado de 1L contendo 300 mL de meio. O inóculo foi levado à uma incubadora com agitação, e mantido a 150 rpm e 30°C por 12 horas. Para a recuperação das células, o conteúdo centrifugado a 2500 rpm e 4°C por 10 minutos.

4.2. Pré-tratamento da biomassa

Parte do bagaço e da palha foram submetidos ao pré-tratamento hidrotérmico, e a outra parte foi submetida ao pré-tratamento ácido. Além disso, após esta etapa, parte das biomassas foi submetida a um tratamento adicional de congelamento.

O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado em reator de alta pressão Parr modelo 4848 com capacidade de 2 L, munido de controle de agitação mecânica e aquecimento. Utilizou-se $195\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min e uma relação sólido:líquido de 1:10 (m/v) (MILESSI et al., 2021). Já o pré-tratamento ácido foi realizado com H_2SO_4 1% em autoclave em condições adaptadas de Philippini (2012), a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos e relação sólido:líquido de 1:10 (m/v). Após a realização de ambos os pré-tratamentos, o material obtido foi filtrado ainda quente e a fração sólida e o hidrolisado obtidos foram armazenados a 4°C para posterior caracterização.

Em seguida, parte das biomassas foi submetida ao congelamento, conforme a metodologia de Smith *et al* (2016). Inicialmente a biomassa foi congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após esse período, foi feito o descongelamento em banho-maria por 15 minutos, e o material foi levado para estufa a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ para secagem por 48 horas e

utilizado nos ensaios BPC.

4.3 Ensaios BPC

Todos os cultivos foram realizados em mini reatores de 13 mL, dotados de saída de CO₂, conforme metodologia de Mesquita e colaboradores (2021). A liberação de CO₂ foi medida a partir da diferença de peso dos mini reatores, a cada 1 hora. A partir destes dados, foi possível acompanhar o andamento da reação de produção de etanol e estimar a variação da conversão ao longo do tempo (PEREZ *et al.*, 2021). Os ensaios foram finalizados quando a massa de CO₂ liberada estabilizou.

Os ensaios BPC foram realizados utilizando-se 6 mL de meio com pH ajustado para 5,5, com alta carga celular e densidade ótica inicial 100 (correspondente a uma concentração de células de 80 g/L) e mantidos à 35 °C em uma plataforma com agitação magnética. Todos os ensaios foram suplementados com extrato de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L). Para os cultivos realizados com hidrolisado real de bagaço e palha, o pH do hidrolisado foi ajustado para 6,0, em seguida foi filtrado, adicionou-se YP e o pH foi ajustado para 5,5. Já para os cultivos realizados com meio sintético, foi preparado o meio com a composição correspondente ao hidrolisado e à fração sólida, de forma a se obter ensaios controle. Foram realizados ensaios biomassa congelada e na presença de proteína de soja, cuja carga estudada foi de 4% (m/v), de acordo com Ramos (2023). Após os ensaios BPC, os mini reatores foram levados à centrífuga a 2500 rpm e 4 °C, por 10 minutos. Parte do sobrenadante foi congelada a -20 °C para posterior análise em HPLC (do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”), e a outra parte foi utilizada como extrato enzimático, para realização da atividade enzimática.

4.3.1 Ensaios BPC com bagaço de cana-de-açúcar

4.3.1.1 Hidrolisado sintético

Foram realizados ensaios de BPC com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e hidrolisado sintético nas seguintes condições:

- (a) Fração sólida do bagaço de cana-de-açúcar resultante do pré-tratamento hidrotérmico e hidrolisado sintético;
- (b) Fração sólida do bagaço de cana-de-açúcar resultante do pré-tratamento hidrotérmico e hidrolisado sintético com adição de proteína de soja;

- (c) Fração sólida do bagaço de cana-de-açúcar resultante do pré-tratamento hidrotérmico com tratamento adicional de congelamento e hidrolisado sintético;
- (d) Fração sólida do bagaço de cana-de-açúcar resultante do pré-tratamento hidrotérmico com tratamento adicional de congelamento e adição de proteína de soja e hidrolisado sintético;

4.3.1.2 Hidrolisado real

Foram realizados ensaios de BPC com bagaço de cana-de-açúcar e hidrolisado real nas seguintes condições:

- (a) Bagaço de cana-de-açúcar e hidrolisado resultantes do pré-tratamento hidrotérmico;
- (b) Bagaço de cana-de-açúcar e hidrolisado resultantes do pré-tratamento hidrotérmico com adição de proteína de soja;
- (c) Bagaço de cana-de-açúcar e hidrolisado resultantes do pré-tratamento hidrotérmico com tratamento adicional de congelamento;
- (d) Bagaço de cana-de-açúcar e hidrolisado resultantes do pré-tratamento hidrotérmico com tratamento adicional de congelamento e adição de proteína de soja.

4.3.2 Ensaios com palha de cana-de-açúcar

Foram realizados ensaios de BPC com palha de cana-de-açúcar nas seguintes condições:

- (e) Palha de cana-de-açúcar e hidrolisado resultantes do pré-tratamento hidrotérmico;
- (f) Palha de cana-de-açúcar e hidrolisado resultantes do pré-tratamento hidrotérmico com adição de proteína de soja;
- (g) Palha de cana-de-açúcar e hidrolisado resultantes do pré-tratamento hidrotérmico com tratamento adicional de congelamento;
- (h) Palha de cana-de-açúcar e hidrolisado resultantes do pré-tratamento hidrotérmico com tratamento adicional de congelamento e adição de proteína de soja;
- (i) Meio sintético correspondente ao hidrolisado e à fração sólida da palha.

4.4 Métodos Analíticos

A viabilidade das leveduras foi avaliada por coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer de acordo com metodologia de Sandri *et al.* (2023). A densidade óptica celular foi realizada por espectroscopia (600 nm) e correlacionada com uma curva de calibração previamente determinada (Equação 3).

$$C_x[g/L] = (0,821 \pm 0,043) \times DO \quad (3)$$

A quantificação de açúcares e proteínas foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para isso, as amostras foram congeladas por 24 horas a -20 °C, depois descongeladas e centrifugadas duas vezes a 2500 rpm e 4 °C, por 5 minutos, de acordo com metodologia estudada por Demeke e colaboradores (2013). Posteriormente, as amostras foram filtradas em filtro de 0,22 µm e levadas para o cromatógrafo, de modelo Waters e2695 dotado de detectores de índice de refração e UV-VIS ($\lambda = 210$ nm). Foi utilizada coluna de exclusão iônica Rezex™ ROA - Organic acid H+ para a quantificação de etanol, glicose, xilose, celobiose, arabinose, glicerol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, e uma solução de ácido sulfúrico de 5 mmol/L foi utilizada como fase móvel em um fluxo de 0,6 mL/min, a 65 °C, conforme metodologia estudada por Batista e colaboradores (2019).

Já para a quantificação de xilooligômeros foi realizada a hidrólise total com ácido sulfúrico. Para isso, foram adicionados 174 µL de uma solução de H₂SO₄ 72% e 5 mL de amostra em um tubo de ensaio fechado com tampa, que foi levado à autoclave a 121 °C, por 20 minutos, conforme metodologia estudada por Nascimento e colaboradores (2016). Em seguida, os tubos foram resfriados, o pH foi neutralizado com CaCO₃ e as amostras foram levadas ao cromatógrafo. Por fim, a quantidade total de xilooligômeros presentes na fração líquida foi determinada pela diferença entre a massa de xilose total obtida após hidrólise dos oligômeros em monômeros na hidrólise ácida e a massa de xilose obtida antes a hidrólise ácida (MILESSI *et al.*, 2021).

4.4.1 Atividades Enzimáticas

4.4.1.1 Xilanase

A atividade enzimática de xilanase foi medida conforme metodologia adaptada de Milessi *et al.*, (2016), a qual baseia-se na liberação de xilose da xilana de faia a 50 °C em pH 5,5 (tampão citrato de sódio 50 mmol/L). Alíquotas foram retiradas em intervalos de 2 min durante 10 minutos para determinação da velocidade de formação de xilose (dP/dt) e os açúcares redutores foram quantificados pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade (UI) foi a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de xilose em 1 min nas condições de ensaio. O controle

foi a alíquota retirada no tempo zero.

4.4.1.2 β -xilosidade

A atividade enzimática de β -xilosidase foi medida conforme metodologia adaptada de Lachke (1988), a qual baseia-se no aumento da absorbância em 405 nm causado pela liberação de 4-nitrofenol ($\epsilon = 1950 \text{ mol/L/cm}$) durante a hidrólise de 4-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo (p-NPX) preparado em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 6,0) a 50 °C. Uma unidade de atividade (UI) foi a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de 4-nitrofenol em 1 min nas condições de ensaio. Um controle foi realizado substituindo a enzima por água destilada.

4.4.1.3 β -glicosidase

A atividade enzimática da β -glicosidase foi medida conforme metodologia adaptada de Voltatódio (2012), a qual quantifica a liberação de glicose da celobiose (2%) preparada em tampão citrato 50 mmol/L (pH 5,5) a 50 °C por 15 min e, posteriormente, aquecido para 100 °C por 10 min a fim de parar a reação. A glicose liberada foi quantificada pelo kit enzimático GOD-PAP. Uma unidade de atividade (UI) foi a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose em 1 min nas condições de ensaio. Um controle foi realizado substituindo a enzima por água destilada.

4.4.1.4 Celulase

A atividade enzimática das celulases totais foi medida conforme metodologia adaptada de Ghose (1987), a qual baseia-se na liberação de glicose do papel de filtro Whatman n° 1 de 15 mm de diâmetro em pH 5,0 (tampão citrato de sódio 50 mmol/L) a 50 °C por 1 h. Os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade (UI) foi considerada a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose em 1 min nas condições de ensaio. Um controle foi realizado substituindo a enzima por água destilada.

A Equação 4 foi utilizada nos cálculos de todas as atividades enzimáticas (RAMOS *et al.*, 2021), onde $(\Delta P/\Delta t)$ é a velocidade de formação de produto (mg/mL/min); V_R é o volume reacional (mL); D é a diluição do extrato enzimático; MM é a massa molar do produto (mg/ μmol); e V_E é o volume de extrato enzimático utilizado

(mL).

$$AE [UI/mL] = \frac{\left(\frac{\Delta P}{\Delta t}\right) \times Vt \times D}{MM \times Ve} \quad (4)$$

4.5 Cálculos

A conversão (X) foi calculada pela Equação 5, no qual C_{si} é a concentração de substrato inicial (g/L), C_{sf} é a concentração de substrato final (g/L), mCO_2t é a massa de CO₂ liberada no tempo analisado (g) e mCO_2f é a massa de CO₂ liberada no tempo final (g).

$$X(\%) = \frac{C_{si} - C_{sf}}{C_{si}} \times \frac{mCO_2t}{mCO_2f} \times 100 \quad (5)$$

O rendimento (Y) foi calculado conforme Equação 6, onde o etanol máximo teórico foi estimado de acordo com os fatores estequiométricos para mono-, di- e polissacarídeos (0,511, 0,538 e 0,57 g/g, respectivamente) (BARROS-RIOS *et al.*, 2015). A produtividade volumétrica (Qp) foi calculada conforme Equação 7, onde C_{pf} corresponde à concentração de produto final, C_{pi} é a concentração de produto inicial e Δt corresponde ao tempo total de fermentação.

$$Y (\%) = \frac{[EtOH \text{ produzido}]}{[EtOH \text{ teórico}]} \times 100 \quad (6)$$

$$Qp (g/L/h) = \frac{C_{pf} - C_{pi}}{\Delta t} \quad (7)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pré-tratamento do bagaço e da palha de cana-de-açúcar

Inicialmente foram feitos os pré-tratamentos ácido e hidrotérmico do bagaço e da palha de cana, conforme descrito anteriormente, as composições dos hidrolisados obtidos estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos hidrolisados resultantes dos pré-tratamentos ácido e hidrotérmico do bagaço e da palha de cana-de-açúcar.

Componente	Bagaço		Palha	
	Hidrotérmico (g/L)	Ácido (g/L)	Hidrotérmico (g/L)	Ácido (g/L)
Glicose	0,38	1,85	0,48	0,63
Xilose	4,22	19,29	1,07	1,15
Celobiose	1,15	0,95	0,00	0
Arabinose	1,41	2,00	0,55	1,32
Xilooligômeros totais	14,68	1,01	14,01	0
Ácido acético	1,67	2,52	1,4	1,15
HMF	0,26	2,25	0,1	0,46
Furfural	1,97	2,33	1,26	0,41
pH do licor	3,5	1,3	3,6	1,3

Os resultados obtidos para o bagaço estão coerentes com o esperado, de acordo com os estudos de Chandel e colaboradores (2021). É possível perceber que o hidrolisado ácido apresenta maior concentração de xilose e glicose, devido ao fato de que os monômeros se solubilizam na presença de ácido. Além disso, o pré-tratamento ácido gera maior quantidade de inibidores, como furfural e hidroximetilfurfural, devido à maior severidade associada a este processo, e isso pode prejudicar o processo de fermentação no BPC. Da mesma forma, o valor do pH do licor ácido foi menor do que o hidrotérmico, visto que no primeiro há adição de ácido e no segundo só se usa água, ocorrendo somente uma produção *in situ* de ácido acético (MILESSI *et al.*, 2021).

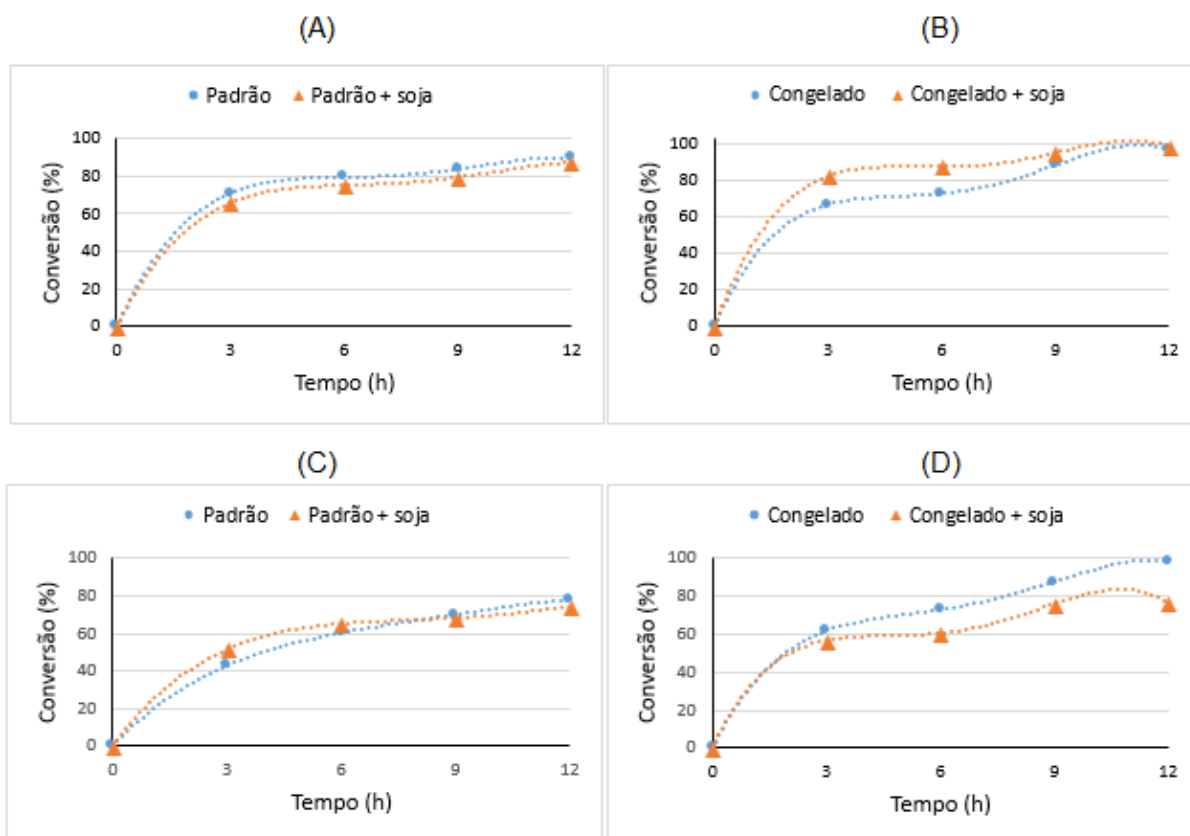
Já com relação à palha, é possível afirmar que o pré-tratamento ácido não gerou resultados tão satisfatórios conforme o esperado, tendo em vista a baixa concentração de açúcares obtida em comparação com os valores obtidos por Moutta *et al.*, (2012) que obtiveram 14,84 g/L de xilose utilizando 3,5% de ácido por 10 min a 110 °C em uma fração sólido líquido de 1:10. Porém, os autores utilizaram uma

concentração expressivamente mais alta de ácido, o que pode explicar o melhor rendimento do processo. Considerando a baixa concentração de açúcares do hidrolisado ácido da palha, as elevadas quantidades de inibidores geradas em ambos os licores ácidos, e que o pré-tratamento hidrotérmico é mais sustentável e não gera resíduos tóxicos, optou-se por realizar os ensaios apenas com as frações sólidas e os hidrolisados resultantes do pré-tratamento hidrotérmico.

5.2 Ensaios BPC com o bagaço de cana-de-açúcar

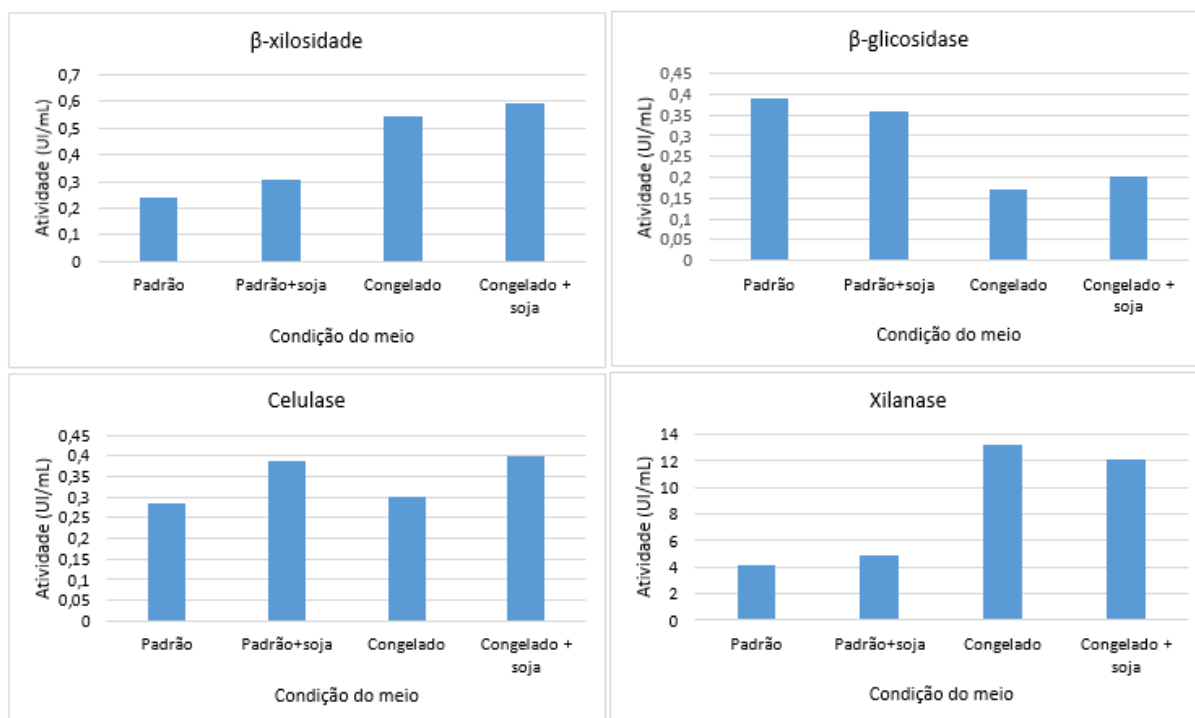
Foram realizados ensaios BPC com a fração sólida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço em duas condições de hidrolisado, sintético e real, avaliando a atuação do congelamento na estrutura das celuligninas e a adição de proteína de soja na adsorção das enzimas. Os dados de conversão de açúcares em função do tempo estão representados na Figura 4, onde observa-se que ambas as condições estudadas apresentaram comportamento muito semelhante, tendo em vista que as curvas praticamente se sobrepõem. Dessa forma, a adição de proteína de soja não teve grandes impactos na adsorção das enzimas. Florencio e colaboradores (2019) obtiveram aumento na produção de etanol a partir de bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente devido à adição de proteína de soja em seus cultivos. Os autores tiveram um aumento de 76% na glicose liberada e de 86% na produção de etanol utilizando 15% de sólidos. Tal diferença pode ser atribuída a maior carga de sólidos utilizada pelos autores. A baixa carga de sólidos (1-2% m/v) utilizada no presente trabalho pode não ter proporcionado uma influência significativa da lignina residual no processo, de forma a não ser possível visualizar a melhoria da adição de proteína de soja.

Figura 4. Conversão de açúcares do bagaço em função do tempo de fermentação na ausência de proteína de soja (curvas em azul) e na presença de proteína de soja (curvas em laranja), sendo (A) e (B) bagaço em hidrolisado sintético sem e com tratamento adicional de congelamento, respectivamente, e (C) e (D) bagaço em hidrolisado real sem e com tratamento adicional de congelamento, respectivamente (a 35 °C, pH=5,5 e DO=100).



Em relação à diferença de meio real e sintético, é possível afirmar que os comportamentos são semelhantes, porém o meio real apresentou conversões menores para os ensaios sem congelamento, atingindo valores inferiores a 80%, que podem estar associados à presença de inibidores gerados no pré-tratamento. Esses resultados estão de acordo com estudos realizados por Nijland e colaboradores (2020), que afirmam que organismos geneticamente modificados são mais sensíveis aos compostos inibidores. As atividades enzimáticas obtidas a partir do extrato enzimático final dos reatores com meio sintético são apresentados na Figura 5.

Figura 5. Atividades enzimáticas finais dos cultivos BPC com bagaço em meio sintético (a 35°C, pH=5,5 e DO₀=100).



É possível afirmar que o congelamento favoreceu a atividade da β-xilosidase e da xilanase, enquanto que a da β-glicosidase foi desfavorecida, e a atividade da celulase não teve alteração significativa. Adicionalmente, a presença de soja aumentou a atividade da β-xilosidase e da celulase em todos os cenários, enquanto que para a β-glicosidase a atividade só aumentou para os cultivos com congelamento e para a xilanase apenas sem congelamento. A concentração de etanol obtida e os parâmetros fermentativos dos ensaios realizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Etanol produzido e parâmetros fermentativos obtidos para os cultivos com bagaço.

Meio	Condição	Etanol (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y relativo (%)	Viabilidade (%)
Sintético	Padrão	11,1±0,8	1,0±0,1	85,6±6,0	93,3±4,6
	Padrão + soja	11,3±0,8	1,0±0,1	86,5±6,1	97,4±4,8
	Congelamento	13,8±0,9	1,3±0,1	97,9±6,7	94,4±4,7
	Congelamento +soja	14,3±1,0	1,3±0,1	98,4±7,9	94,2±4,6
Real	Padrão	10,1±0,7	0,9±0,1	77,3±5,5	90,2±1,4
	Padrão + soja	9,8±0,7	0,9±0,1	75,6±5,2	95,6±4,7
	Congelamento	14,1±1,0	1,3±0,1	98,3±7,6	94,5±4,5
	Congelamento +soja	10,0±0,7	0,9±0,7	76,5±5,7	91,9±2,5

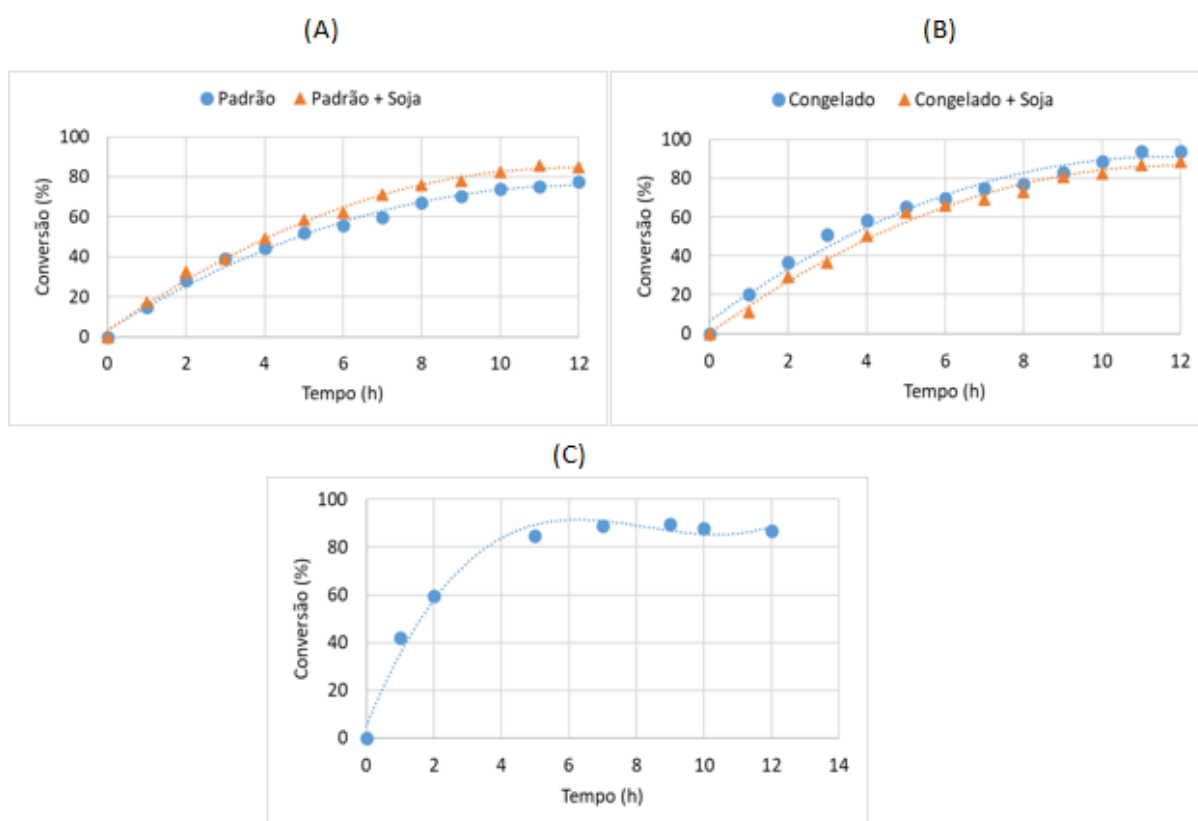
Os valores de produção de etanol obtidos para o bagaço com tratamento adicional de congelamento foram promissores, sendo próximos de 14 g/L tanto para o meio real quanto para o meio sintético. Além disso, a produtividade volumétrica alcançada em todos os cultivos foi superior aos estudos de Santos e colaboradores (2010), que realizaram experimentos com bagaço pré-tratado hidrotêrmicamente e fermentação e sacarificação simultâneas (SSF) com levedura *Saccharomyces cerevisiae*, no qual obtiveram 0,25 g/L/h, enquanto neste estudo obteve-se valores próximos a 1,0g/L/h, destacando a superioridade do BPC à SSF. Perez (2021) realizou cultivos com a AC14 em Bioprocessamento Consolidado, com meio sintético composto por xilose, glicose, celobiose e xilana de sabugo de milho, com as mesmas condições de DO e pH deste trabalho, e obteve concentração final de etanol por volta de 25 g/L, mostrando a eficiência do BPC e da levedura para a produção de etanol 2G. Já em meios industriais reais, há uma escassez de trabalhos na literatura, uma vez que a grande maioria dos trabalhos focam na construção da cepa para o BPC.

O rendimento relativo ao etanol foi acima de 80% tanto para o meio sintético quanto para o meio real, com destaque para as biomassas congeladas, que ultrapassaram 97%. Outros estudos já apontavam a melhora da exposição das fibras após o processo de congelamento. Sun e colaboradores (2022) congelaram palha de trigo a -80°C por 24 horas e obtiveram 57,1% de hidrólise de celulose na presença de 20 FPU/g de β -glicosidase. Smith e colaboradores (2016) congelaram *Juncus maritimus* nas mesmas condições deste trabalho, na presença de CellicCTec2, que consiste em um coquetel enzimático, e obtiveram uma concentração máxima de glicose, de 63,8 g/L.

5.3 Ensaio BPC com a palha de cana-de-açúcar

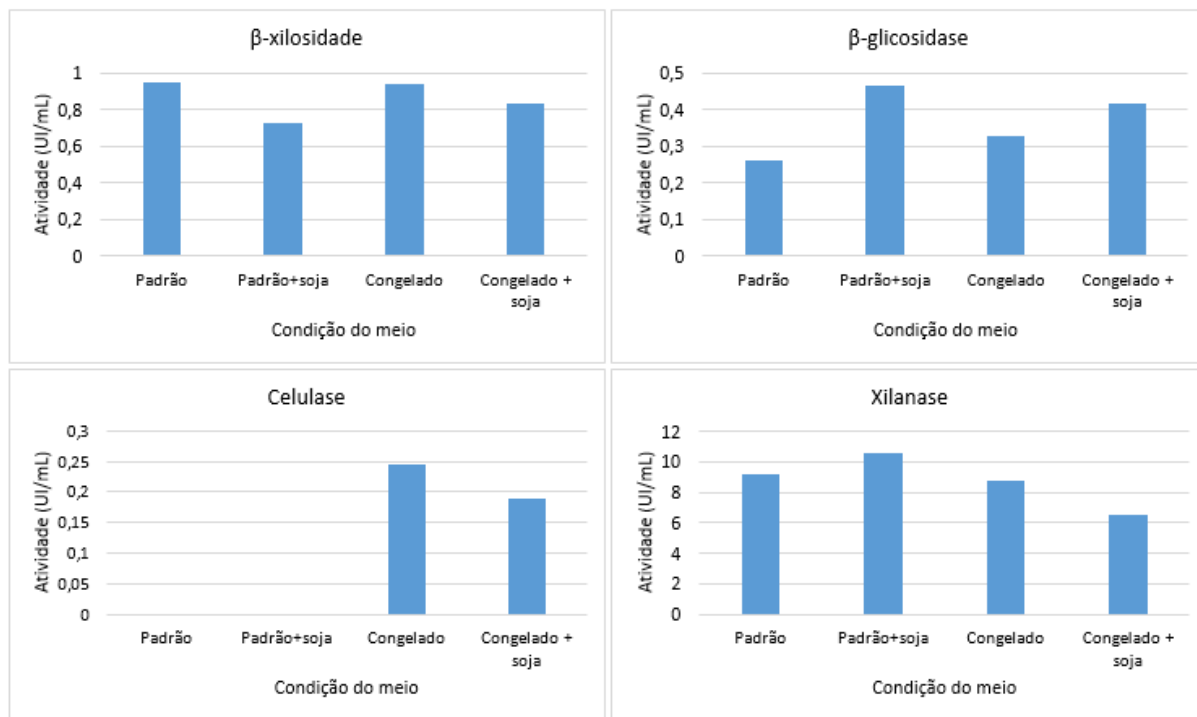
Da mesma forma, foram realizados ensaios BPC com a fração sólida e o hidrolisado resultantes do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar, avaliando a atuação do congelamento na estrutura das celuligninas e a adição de proteína de soja para evitar a adsorção das enzimas. Os dados de conversão dos açúcares ao longo do tempo estão apresentados na Figura 6.

Figura 6. Conversão de açúcares da palha em função do tempo de fermentação para os cultivos BPC realizados na ausência de proteína de soja (curvas em azul) e na presença de proteína de soja (curvas em laranja), sendo (A) sem tratamento adicional de congelamento, (B) com tratamento adicional de congelamento e (C) apenas meio sintético (a 35°C, pH=5,5 e DO₀=100).



Diferentemente do observado para o bagaço, os cultivos com palha foram beneficiados pela adição de proteína de soja, com um aumento de 7,5% na conversão. Já o congelamento da biomassa proporcionou um aumento de 16,5% da conversão do processo. As atividades enzimáticas finais são apresentadas na Figura 7.

Figura 7. Atividades enzimáticas em função do tempo para os cultivos com palha em meio real, a 35°C, pH=5,5 e DO₀=100.



A atividade da β -xilosidase foi favorecida pelo tratamento de congelamento e desfavorecida pela adição de proteína de soja, enquanto que a β -glicosidase foi favorecida por ambos, mas o destaque foi para os cultivos apenas com adição de proteína de soja. A atividade da xilanase foi maior para os experimentos sem congelamento, e a adição de proteína de soja favoreceu a atividade enzimática, prevenindo a adsorção das enzimas. Em contrapartida, é possível observar um comportamento interessante nas celulases, uma vez que os cultivos com tratamento de congelamento foram favorecidos, enquanto que os sem congelamento apresentaram atividades baixíssimas. A concentração de etanol produzida e os demais parâmetros dos cultivos estão apresentados na Tabela 3. Pratto e colaboradores (2016) caracterizaram a palha pre-tratada hidrotérmicamente, obtendo 58 % de celulose, 8,23 % de hemicelulose e 25 % de lignina. Com base nesses dados, e considerando a composição do hidrolisado apresentada na Tabela 1, a quantidade máxima de etanol que este processo poderia é de 16,3 g/L. Vale ressaltar que para todos os experimentos a viabilidade celular foi superior a 90 %, apesar da agitação

magnética e da presença da fração sólida.

Tabela 3. Etanol produzido e parâmetros fermentativos obtidos para os cultivos com palha.

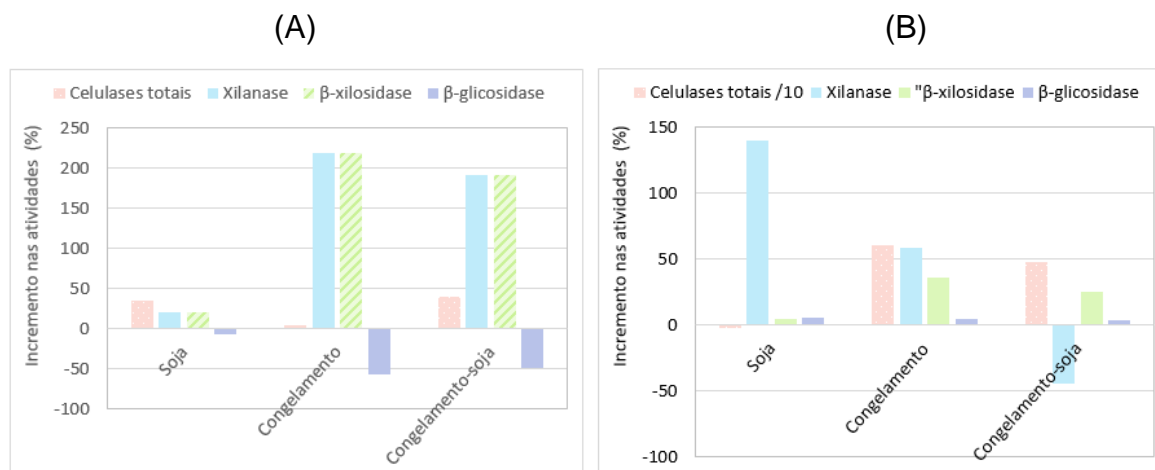
Condição	Etanol (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y relativo (%)	Viabilidade (%)
Meio sintético	13,8±1,0	1,2±0,1	86,8±0,9	95,4±2,0
Padrão	12,6±0,8	1,1±0,1	77,4±0,6	98,4±0,8
Padrão + soja	13,8±1,4	1,2±0,1	84,9±1,4	98,5±0,2
Congelamento	15,3±1,8	1,3±0,1	93,9±1,2	92,9±2,1
Congelamento +soja	14,4±0,4	1,2±0,1	88,6±0,5	96,6±0,7

5.4 Análise comparativa

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam como o tipo de biomassa utilizada influencia diretamente na performance do processo e na estratégia de processamento da biomassa a ser aplicada. O hidrolisado resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço apresentou maior concentração de xilose, celobiose e arabinose do que o hidrolisado resultante do pré-tratamento da palha, o que sugere que o bagaço seja mais susceptível à hidrólise do que a palha,

Quanto aos cultivos BPC, enquanto o congelamento se mostrou interessante nos ensaios com bagaço, o congelamento e a adição de proteína de soja foram efetivos para aumentar a conversão do processo utilizando palha como substrato. A Figura 7 mostra os incrementos em porcentagem em relação à condição padrão (sem congelamento e sem adição de soja) das atividades enzimáticas secretadas nos cultivos utilizando diferentes estratégias de BPC. Nos experimentos com bagaço, as enzimas β -xilosidase e xilanase foram favorecidas pelo congelamento, enquanto que a β -glicosidase foi favorecida nas condições sem congelamento. Já para os experimentos com a palha, de modo geral, o congelamento favoreceu todas as enzimas. As celulases apresentaram atividades muito baixas para os meios sem congelamento e foram muito favorecidas pelo congelamento. A atividade da xilanase foi favorecida pela adição de proteína de soja sem congelamento. No geral, para os experimentos com bagaço, a adição de proteína de soja não afetou significativamente a adsorção das enzimas, enquanto que para a palha, a atividade de xilanase foi muito favorecida. Já o congelamento mostrou-se uma alternativa interessante para aumentar a atividade enzimática para ambas biomassas.

Figura 8. Incrementos em porcentagem em relação à condição padrão (sem congelamento e sem adição de soja) das atividades enzimáticas secretadas nos cultivos utilizando diferentes estratégias de BPC para o bagaço (A) e para a palha (B).



Apesar das diferenças observadas quanto às atividades enzimáticas após as estratégias estudadas, tanto para o bagaço quanto a palha, os cultivos com congelamento sem presença de soja alcançaram valores mais altos de produção de etanol e produtividade. Assim, pode-se afirmar que o congelamento favorece a produção de etanol para cultivos em meios industriais reais, independente da biomassa utilizada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da importância da utilização integral dos co-produtos agrícolas para o desenvolvimento de Biorrefinarias sustentáveis, os resultados obtidos evidenciaram o potencial da tecnologia BPC para a produção de bioprodutos como o etanol 2G a partir de biomassa lignocelulósica sem a necessidade da utilização de coquetéis enzimáticos

O uso de proteína de soja como molécula bloqueadora para impedir a adsorção das enzimas hidrolíticas na lignina não favoreceu a atividade enzimática nas condições estudadas para bagaço. Já para a palha, uma melhoria no processo foi observada, evidenciando a influência do tipo de biomassa no processo. Porém, o congelamento da fração sólida pré-tratada aumentou a atividade enzimática do caldo fermentado, melhorando a hidrólise do material e a produção de etanol em ambas as biomassas estudadas, mostrando-se uma técnica importante para o BPC independentemente da biomassa utilizada.

As informações aqui levantadas contribuem de forma importante para o desenvolvimento do BPC de bagaço e palha de cana, além de contribuir de forma geral com o BPC de materiais lignocelulósicos reais com potencial de aplicação no contexto da indústria sucroalcooleira.

7. REFERÊNCIAS

- ADITIYA, H. B. et al. Second generation bioethanol potential from selected Malaysia's biodiversity biomasses: A review. *Waste Management*, v. 47, p. 46–61, 2016.
- AGUIAR, A., MILESSI, T.S., MULINARI, D.R., LOPES, M.S., COSTA, S.M., CANDIDO, R.G. Sugarcane straw as a potential second generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications. *Biomass and Bioenergy*, v.144, p.105896, 2021.
- AMOAHA, Jerome et al. Development and evaluation of consolidated bioprocessing yeast for ethanol production from ionic liquid-pretreated bagasse. *Bioresource Technology*, v. 245, p. 1413-1420, 2017.
- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a 138 key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v. 7, n. 2, p. 163–173, 1 abr. 2014.
- BARROS-RIOS J, ROMANÍ A, GARROTE G, ORDAS B. Biomass, sugar, and bioethanol potential of sweet corn. *GCB Bioenergy* 2015;7:153–60. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12136>
- BARUAH, J.; NATH, B. K.; SHARMA, R.; KUMAR, S.; DEKA, R. C.; BARUAH, D. C.; KALITA, E. Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. *Frontiers in Energy Research*, v. 6, p. 141, 18 dez. 2018. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>.
- BATISTA, G., Souza, R.B.A., Pratto, B., dos Santos-Rocha, M.S.R., Cruz, A.J.G., 2019. Effect of severity factor on the hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. *Bioresource Technology* 275, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.073>
- BEZERRA, T. L.; RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 10, n. 5, p. 634–647, set. 2016.
- BINOD, P. et al. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. In: *Biofuels*. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 229–250.
- BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; VERMA, P. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 6, n. 1, p. 40, dez. 2019. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276->

2

CANILHA, L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 38, n. 9, p. 1467-1475, 2011.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, 2012.

CAMARGO, Augusto Tolentino; SIMÕES, André Felipe; PACCA, Sérgio Almeida. O potencial de mitigação da mudança climática dos vetores energéticos da cana-de-açúcar na frota paulistana de veículos leves. *Revista Tecnologia e Sociedade*, v. 15, n. 37, 2019.

CARVALHO, A.F.A.; NETO, P.O.; SILVA, D.F.; PASTORE, G.M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v.51, 75-85, 2013.

CHANDEL, A.K., Forte, M.B.S., Gonçalves, I.S., Milessi, T.S., Arruda, P.V., Carvalho, W., Mussatto, S.I., 2021. Brazilian biorefineries from second generation biomass: critical insights from industry and future perspectives. *Biofuels, Bioprod. Bio-ref.* 15, 1190–1208. <https://doi.org/10.1002/bbb.2234>

CHANG, K.; THITIKORN-AMORN, H.; HSIEH, J.; OU, B.; CHEN, S.; RATANAKHANOKCHAI, K.; HUANG, P.; CHEN, S. Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. *Biomass and Bioenergy*, v.35, p. 90-95, 2011.

CHEAH, W. Y.; SANKARAN, R.; SHOW, P. L.; TG. IBRAHIM, Tg. N. B.; CHEW, K. W.; CULABA, A.; CHANG, J.-S. Pretreatment methods for lignocellulosic biofuels production: current advances, challenges and future prospects. *Biofuel Research Journal*, v. 7, n. 1, p. 1115–1127, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.18331/BRJ2020.7.1.4>.

CLAES, A.; DEPARIS, Q.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Simultaneous secretion of seven lignocellulolytic enzymes by an industrial second generation yeast strain enables efficient ethanol production from multiple polymeric substrates. *Metabolic Engineering*, v. 59, p. 131–141, maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.02.004>.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <
<https://agenciagov.ebc.com.br/noticias/202404/producao-de-cana-de-acucar-na->

[safra-2023-24-chega-a-713-2-milhoes-de-toneladas-a-maior-da-serie-historica#:~:text=Agricultura-,Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20cana%2Dde%2Da%C3%A7%C3%BAcar%20na%20safra%202023%2F24,da%20s%C3%A9rie%20hist%C3%B3rica%20da%20Conab&text=A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20brasileira%20de%20cana,Nacional%20de%20Abastecimento%20\(Conab\).>](#), Acesso em dezembro de 2024.

CORRÊA, A. G.; GALLO, J. M. R. Biomassa - Estrutura, Propriedades e Aplicações. [S. I.]: EdUFSCar, 2020.

CUNHA, Joana T. et al. Consolidated bioprocessing of corn cob-derived hemicellulose: engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae* as efficient whole cell biocatalysts. *Biotechnology for biofuels*, v. 13, p. 1-15, 2020.

DA SILVA, Késia Limoeiro; DAS CHAGAS, Kevin Carvalho; DA CRUZ, Marianne Carvalho Pinheiro. Produção de biocombustíveis a partir de resíduos vegetais. **Bolsista de Valor**, v. 2, p. e183-190, 2012.

DEMEKE, M.M., Dietz, H., Li, Y., Foulquié-Moreno, M.R., Mutturi, S., Deprez, S., Den Abt, T., Bonini, B.M., Liden, G., Dumortier, F., Verplaetse, A., Boles, E., Thevelein, J.M., 2013. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnol Biofuels* 6, 89. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-89>

DIAZ, J. T.; CHINN, M. S.; TRUONG, V.-D. Simultaneous saccharification and fermentation of industrial sweetpotatoes for ethanol production and anthocyanins extraction. *Industrial Crops and Products*, v. 62, p. 53–60, dez. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.032>.

ELIAS, A. M. et al. Retro-techno-economic-environmental analysis improves the operation efficiency of 1G-2G bioethanol and bioelectricity facilities. *Applied Energy*, v. 282, p. 116133, jan. 2021.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Addition of Soybean Protein Improves Saccharification and Ethanol Production from Hydrothermally Pretreated Sugarcane Bagasse. *BioEnergy Research*, v. 12, n. 1, p. 81–93, mar. 2019. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9956-6>.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Soybean protein as a cost effective lignin-blocking additive for the saccharification of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 221, p. 172–180, dez. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.039>.

FURLAN, Felipe F. et al. Bioelectricity versus bioethanol from sugarcane bagasse: is it worth being flexible?. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-12, 2013.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257–268, 1987.

JIN, Y.-L.; SPEERS, R. A. Effect of Environmental Conditions on the Flocculation of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 58, n. 3, p. 108–116, jun. 2000. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-58-0108>.

LACHKE, A. H. 4-b-D-xylan xylohydrolase of *Sclerotium rolfsii*. *Methods Enzymol*, v. 160, p. 679–684, 1988.

LI, M. F. et al. Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: Characterization of the cellulose rich fraction. *Industrial Crops and Products*, v. 32, n. 3, p. 551–559, 2010.

LIAO, Y. et al. A sustainable wood biorefinery for low-carbon footprint chemicals production. *Science*, v. 367, n. 6484, p. 1385–1390, 2020.

LIU, S; LIN,B; YANG, X; ZHANG,Q. Carbon-nanotube-enhanced direct electron-transfer reactivity of hemoglobin immobilized on polyurethane elastomer film. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.111, n.5, p. 1182-1188, 2007.

LOPES, Jéssica Guimarães; DOS SANTOS, Kamila Cavalcante; COSTA, Andréia Alves. Prospecção tecnológica do uso do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração. **Cadernos de Prospecção**, v. 10, n. 3, p. 590-590, 2017.

LUO, Y. et al. The production of furfural directly from hemicellulose in lignocellulosic biomass : A review. *Catalysis Today*, v. 319, n. December 2017, p. 14–24, 2019.

MESQUITA, T.J.B., Sandri, J.P., de Campos Giordano, R., Horta, A.C.L., Zangirolami, T.C., 2021. A High-Throughput Approach for Modeling and Simulation of Homofermentative Microorganisms Applied to Ethanol Fermentation by *S. cerevisiae*. *Industrial Biotechnology* 17, 13–26. <https://doi.org/10.1089/ind.2020.0034>

MILESSI, T.S., Corradini, F.A.S., Marçal, J.V.M., Baldez, T.O., Kopp, W., Giordano, R.C., Giordano, R.L.C., 2021. Xylooligosaccharides production chain in sugarcane biorefineries: From the selection of pretreatment conditions to the evaluation of nutritional properties. *Industrial Crops and Products* 172, 114056.

MILESSI, T. S. DOS S. Produção de etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente

modificada immobilizadas. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2017.

MILESSI, T. S. S.; KOPP, W.; ROJAS, M. J.; MANRICH, A.; BAPTISTA-NETO, A.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SAN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. *Catalysis Today*, v. 259, p. 130–139, jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.05.032>.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Suga. *Analytical chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MISCHNICK, P.; MOMCILOVIC, D. *Chemical Structure Analysis of Starch and Cellulose Derivatives*. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 64

MORALES-RODRIGUEZ, R.; GERNAEY, K. V.; MEYER, A. S.; SIN, G. A Mathematical Model for Simultaneous Saccharification and Co-fermentation (SSCF) of 126 C6 and C5 Sugars. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, v. 19, n. 2, p. 185–191, abr. 2011. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(11\)60152-3](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60152-3).

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MOUTTA, R. O. et al. Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process. *Sugar Tech*, v. 14, p. 53-60, 2012.

MUSSATTO, S. I. et al. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy*, v. 92, p. 763–768, 2012.

NASCIMENTO, V.M., Manrich, A., Tardioli, P.W., de Campos Giordano, R., de Moraes Rocha, G.J., Giordano, R. de L.C., 2016. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. *Bioethanol* 2. <https://doi.org/10.1515/bioeth-2016-0008>

NIJLAND, J. G.; DRIESSEN, A. J. M. Engineering of Pentose Transport in *Saccharomyces cerevisiae* for Biotechnological Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, n. January, p. 1–13, 2020.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 25–33, 1 ago. 2000.

OCTAVE, S., THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*,

v.91, 659-664, 2009.

OLGUIN-MACIEL, E.; SINGH, A.; CHABLE-VILLACIS, R.; TAPIA-TUSSELL, R.; RUIZ, H. A. Consolidated Bioprocessing, an Innovative Strategy towards Sustainability for Biofuels Production from Crop Residues: An Overview. *Agronomy*, v. 10, n. 11, p. 1834, 22 nov. 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111834>.

ORTENZIO, Ygor Tadeu et al. Cultivo de microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 5, n. 1, 2015.

PARISUTHAM, V.; KIM, T. H.; LEE, S. K. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. *Bioresource Technology*, v. 161, p. 431–440, 2014.

PEREZ, Caroline L. et al. Evaluation of consolidated bioprocessing of sugarcane biomass by a multiple hydrolytic enzyme producer *Saccharomyces* yeast. *BioEnergy Research*, v. 16, n. 4, p. 1973-1989, 2023.

PEREZ, Caroline L. et al. Unraveling continuous 2G ethanol production from xylose using hemicellulose hydrolysate and immobilized superior recombinant yeast in fixed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 169, p. 107963, 2021.

PEREZ, Caroline Lopes. Produção de etanol 2g em reator de leito fixo e por bioprocessamento consolidado utilizando leveduras de alta performance. 2021.

PITARELO, Ana Paula. Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. 2013.

PHILIPPINI, Rafael Rodrigues. **Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PRATTO, Bruna et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane straw: kinetic study and semi-mechanistic modeling. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 178, p. 1430-1444, 2016.

RAMOS, M.D.N. Desenvolvimento de bioprocessamento consolidado utilizando levedura com secreção de enzimas hidrolíticas. 2023.

RAMOS, M.D.N., ZANGIROLAMI, T.C., GIORDANO, R.L.C., MILESSI, T.S. Simultaneous Isomerization and Fermentation (SIF) of sugarcane bagasse hydrothermal hemicellulose hydrolysate. *Brazilian Journal of Development*, v.7, p.8029-8042, 2021.

REMPEL, Alan et al. Produção de bioetanol e biometano a partir da biomassa de spirulina sp. 2018.

SANDRI, Juliana P. et al. Solid feeding and co-culture strategies for an efficient enzymatic hydrolysis and ethanol production from sugarcane bagasse. **Environmental Technology & Innovation**, v. 30, p. 103082, 2023.

SANSEVERINO, A. M. Microondas em Síntese Orgânica. *Química Nova*, v. 25, n.4, p. 660-667, 2002.

SANTOS, Julliana Ribeiro Alves dos et al. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, p. 904-908, 2010.

SANTOS, Adriana Maria dos et al. Caracterização química da biomassa: potencial da palha da cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. 2018.

SHARMA, N. K. et al. Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 125, n. 3, p. 346–352, 2018.

SHARMA, B., LARROCHE, C., DUSSAP, C.G. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource 19 Technology*, v.313, p.123630, 2020.

SILVA, Ricardo Justino da. Efeito de pré-tratamento hidrotérmico na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. 2012.

SINGH, N.; MATHUR, A. S.; GUPTA, R. P.; BARROW, C. J.; TULI, D.; PURI, M. Enhanced cellulosic ethanol production via consolidated bioprocessing by *Clostridium thermocellum* ATCC 31924☆. *Bioresource Technology*, v. 250, p. 860–867, fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.048>.

SMICHI, N., Messaoudi, Y., Moujahed, N., Gargouri, M., 2016. Ethanol production from halophyte *Juncus maritimus* using freezing and thawing biomass pretreatment. *Renewable Energy* 85, 1357–1361. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.010>

SUN, Jianhong; DENG, Y.; LI, S.; XU, W.; LIU, G. Enhanced efficiency of enzymatic hydrolysis of wheat straw via freeze–thaw pretreatment. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 29, n. 37, p. 56696–56704, ago. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18893-w>.

TIZAZU, B. Z.; MOHOLKAR, V. S. Kinetic and thermodynamic analysis of dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 250, n. November

2017, p. 197–203, 2018.

USMANI, Zeba et al. Biorrefinarias lignocelulósicas: o estado atual dos desafios e estratégias para comercialização eficiente. *Renewable and sustainable energy reviews*, v. 148, p. 111258, 2021.

VOLTATÓDIO, M. L. Caracterização bioquímica e biofísica da Celobiohidrolase II do fungo *Trichoderma harzianum* IOC3844 produzida por expressão homóloga. 2012. Universidade Federal de São Carlos, 2012.

WASYLENKO, T. M.; STEPHANOPOULOS, G. Metabolomic and ¹³C-metabolic flux analysis of a xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing xylose isomerase. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 112, n. 3, p. 470–483, 2015

YAMAKAWA, C.K., Qin, F., Mussatto, S.I., 2018. Advances and opportunities in biomass conversion technologies and biorefineries for the development of a bio-based economy. *Biomass and Bioenergy* 119, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.007>

YUE, P.; HU, Y.; TIAN, R.; BIAN, J.; PENG, F. Hydrothermal pretreatment for the production of oligosaccharides: A review. *Bioresource Technology*, v. 343, p. 126075, jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126075>.