UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

SIMONE COELHO NAKANISHI

# Estudo da ampliação de escala do processo de pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol de segunda geração

Lorena - SP
2016

SIMONE COELHO NAKANISHI

# Estudo da ampliação de escala do processo de pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol de segunda geração

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa.

Orientador:
Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha

**Edição reimpressa e corrigida**

Lorena - SP

2016

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nakanishi, Simone Coelho
Estudo da ampliação de escala do processo de pré tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol de segunda geração / Simone Coelho Nakanishi; orientador George Jackson de Moraes Rocha - ed. reimp., corr. - Lorena, 2016.
188 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2016
Orientador: George Jackson de Moraes Rocha

1. Pré-tratamento alcalino. 2. Ampliação de escala. 3. Etanol de segunda geração. I. Título. II. Rocha, George Jackson de Moraes, orient.

*Dedico a minha família - pais, irmãos e sobrinhos - que me deram amor e apoio incondicional para a concretização deste sonho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. Agradeço também:

A minha família - mãe, pai, irmãos, tios e sobrinhos - pelo apoio e incentivo, pelas orações a cada momento difícil dessa jornada e pelas celebrações a cada conquista;

Ao Prof. Dr. George Jackson que, além de orientador, considero um amigo. Agradeço pelos ensinamentos e pela contribuição para meu crescimento pessoal, científico e intelectual;

Ao Departamento de Biotecnologia, a Escola de Engenharia de Lorena e a Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização deste curso;

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol - CTBE e ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM por disponibilizarem sua infraestrutura e pessoal para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a todos os colegas de laboratório, pesquisadores, alunos, técnicos, estagiários e colaboradores do centro, principalmente a: Vivi, Tati, Edgar, Leila, Lívia, Cris, Ana, Roger, André, Dani, Karen, Fer, Clau, Kiane, Lauren, Suzy e Carol, pelo suporte ao desenvolvimento do trabalho, pela amizade, pelo apoio, pelos conselhos, pelos almoços, cafés e risadas...

Em especial, a Dra. Jaciane Ienczak (CTBE) pela colaboração e apoio, principalmente nas fermentações, para a finalização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves pelo apoio e colaboração de sempre;

A Dra. Silvana Rocco e ao Laboratório Nacional de Biociências - LNBio, pelas análises de RMN; ao técnico Fabiano Montoro e ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia - LNNano, pelas análises microscópicas; ao Dr. Carlos Driemeier (CTBE) pelas análises de raios-X e sorção de vapor; a Dra Vera Gouveia (CTBE) pela análise de viabilidade técnica.

Ao Prof. Dr. José Carlos del Río, do Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla - IRNAS, na Espanha, pelas análises de lignina;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa no primeiro ano deste projeto;

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa;

Aos pimpolhos: Angélica, Érica, Pedro e Renan pela amizade em todas as horas.

Aos amigos Willian, Yuri, Iago, Jow e Gigas por tornarem a caminhada mais leve.

Muito obrigada!

*"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."*

*Arthur Schopenhauer*

# RESUMO

NAKANISHI, S. C. **Estudo da ampliação de escala do processo de pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol de segunda geração.** 2016. 188 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2016.

No presente trabalho, dados de ampliação de escala, de um processo de pré-tratamento alcalino em escala laboratorial (2L) para escala piloto (350L) foram avaliados. Os experimentos realizados previamente em escala laboratorial apontaram duas condições potenciais para a ampliação de escala, a saber: Ensaio 5 (130°C, 30 min, 1,5% m/v NaOH, 0,15% m/m antraquinona) apresentando a maior conversão enzimática da polpa obtida (64,5%) e Ensaio 7 (170°C, 1,5 % m/v NaOH, 30 min, 0,15% m/m antraquinona) com a maior solubilização de lignina (81,0 %). Os experimentos em escala piloto foram realizados nas condições apontadas, com e sem a adição de antraquinona. A reprodutibilidade dos dados em escala piloto foi satisfatória, considerando o sistema de aquecimento e agitação mais eficientes do reator piloto em relação ao reator usado no laboratório. O uso da antraquinona diminuiu a solubilização de carboidratos durante o pré-tratamento (evitando 67% de solubilização quando comparado à reação sem antraquinona, a 130°C), mas interferiu negativamente na etapa subsequente de hidrólise, principalmente na reação a 170°C. Dentre as condições testadas, o ensaio 5Pil/AQ (130°C, 30 min, 1,5% NaOH e 0,15% m/m antraquinona) foi eleito como a melhor condição de pré-tratamento, com maior rendimento em carboidratos após a hidrólise enzimática, sendo possível obter (extrapolando os resultados) 290 kg de glicose e 98 kg de xilose a partir de uma tonelada de bagaço (base seca). Para a obtenção de etanol a partir desse hidrolisado, foram realizadas fermentações com três diferentes leveduras - *S. cerevisiae* CAT-1, *S. stipitis* NRRL Y-7124 e *S. passalidarum* NRRL Y-27907. O melhor resultado foi apresentado para fermentação em batelada alimentada aplicando reciclo de células utilizando a levedura *S. passalidarum*, produzindo 23,3 g/L de etanol (97 % do teórico) com produtividade de 0,90 g/L.h em 24 h de fermentação no terceiro reciclo. O processo de pré-tratamento alcalino gera, além da polpa rica em carboidratos, um hidrolisado rico em lignina. A lignina foi precipitada desse hidrolisado após cada pré-tratamento realizado e caracterizada, apresentando poder calorífico entre 22,8 e 25,3 MJ/kg.

Palavras-chave: Pré-tratamento alcalino. Ampliação de escala. Etanol de segunda geração.

# ABSTRACT

NAKANISHI, S. C. **Scale up study of sugarcane bagasse alkaline pretreatment process for second generation ethanol production**. 2016. 188 p. Thesis (Doctor of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2016.

In this study, data scale up for an alkaline pretreatment process from lab to pilot scale was evaluated. Lab scale experiments indicated two potential conditions for the scale-up, namely: 130°C, 30 min, 1.5% w/v NaOH, 0.15% w/w anthraquinone , presenting the highest enzymatic conversion (64.5%); and 170°C, 30 min, 1.5% w/v NaOH, 0.15% w/w anthraquinone with the highest lignin solubilization (81.0 %). The experiments were performed on pilot scale under the aforementioned conditions, with and without anthraquinone. Data reproducibility on pilot scale was satisfactory considering the more efficient heating and stirring reactor system when compared to the reactor in lab scale. Anthraquinone decreases the solubilization of carbohydrates during pretreatment (avoiding 67% solubilization compared to the reaction without anthraquinone, at 130°C), but interferes negatively in the subsequent hydrolysis step, mostely at 170°C. Among the conditions tested, the test performed at 130°C, 30 min, 1.5% w/v NaOH and with 0.15% w/w anthraquinone was chosen as the best pretreatment condition, with the highest carbohydrate conversion after enzymatic hydrolysis, allowing 290 kg of glucose and 98 kg of xylose per a dry base ton of bagasse. In order to produce ethanol from this hydrolyzate, fermentations with three different yeasts were performed - *S. cerevisiae* CAT-1, *S. stipitis* NRRL Y-7124, *S. passalidarum* NRRL Y-27907. Fed-batch fermentation with *S. passalidarum* cell recycling provided the best result, yielding 23.3 g/L ethanol, 97 % (theoretical yield) with 0.90 g/L.h productivity within 24 h of fermentation. The alkaline pretreatment process generates, besides the pulp rich in carbohydrates, a lignin-rich hydrolyzate. Lignin was precipitated from the hydrolyzate obtained after each pretreatment carried out and characterized, presenting heating values between 22.8 and 25.3 MJ/kg.


Keywords: Alkaline pretreatment. Scale-up. Second generation ethanol.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Repartição das ofertas de energia interna.

**Figura 2.** Representação esquemática das associações químicas que ocorrem na parede celular vegetal.

**Figura 3.** Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes.

**Figura 4.** Unidades fenilpropano precursoras da lignina.

**Figura 5.** Estrutura fenilpropano e principais ligações de lignina.

**Figura 6.** Esboço da estrutura média da lignina de palha de cana obtida por acidólise.

**Figura 7.** Mecanismo de degradação da lignina em meio alcalino com eliminação no carbono alfa.

**Figura 8.** Mecanismo de degradação da lignina em meio alcalino com eliminação no carbono gama.

**Figura 9.** Mecanismo da reação de peeling.

**Figura 10.** Mecanismo de ação da antraquinona.

**Figura 11.** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico.

**Figura 12**. CBH II de *T. reesei*, mostrando o túnel catalítico de 20 Å.

**Figura 13.** Domínio catalítico de endoglucanase II de *Thermobifida fusca.*

**Figura 14**. Limitantes da hidrólise enzimática da celulose.

**Figura 15.** Fluxograma esquemático do pré-tratamento em escala piloto.

**Figura 16.** Fluxograma esquemático com as correntes de entrada e saída do processo.

**Figura 17.** Reator de Hidrólise.

**Figura 18**. Representação esquemática da inoculação dos frascos de fermentação.

**Figura 19**. Comparação da solubilização de celulose, hemicelulose e lignina para os ensaios realizados em escala laboratorial (Lab) em um reator de 2 L e em escala piloto (Pil) em um reator de 350 L.

**Figura 20**. Espectro na região do infravermelho do material in natura e das polpas obtidas nos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/AQ.

**Figura 21**. Espectro na região do infravermelho com ampliação na banda 3337 $cm^{-1}$ do material in natura e das polpas obtidas nos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/AQ.

**Figura 22.** Espectro na região do infravermelho com ampliação na banda 1604 cm-1 do material in natura e das polpas obtidas nos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/AQ.

**Figura 23**. Espectro na região do infravermelho com ampliação na banda 1246 $cm^{-1}$ do material in natura e das polpas obtidas nos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/AQ.

**Figura 24**. Espectro na região do infravermelho com ampliação na banda 897 $cm^{-1}$ das polpas obtidas nos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/AQ e uma celulose comercial Avicel.

**Figura 25**. Espectro na região do infravermelho com ampliação na banda 1510 $cm^{-1}$.

**Figura 26.** Espectro de infravermelho na região de 850 $cm^{-1}$ a 1150 $cm^{-1}$ para as polpas obtidas pelo pré-tratamento em escala piloto e uma celulose Avicel.

**Figura 27.** Micrografias do bagaço e polpas em diferentes ampliações. (A, B, C) Bagaço in natura; (D, E) Polpa 5Pil/SAQ; (F,G) Polpa 7Pil/SAQ; (H, I) Polpa 5Pil/AQ; (J,K) Polpa 7Pil/AQ.

**Figura 28.** Dados brutos para cinética de sorção de vapor. 1 - Polpa do Ens. 7Pil/SAQ. 2 - Polpa do Ens. 7Pil/AQ.

**Figura 29.** Isotermas de sorção e dessorção das duas polpas analisadas.

**Figura 30.** Comparação do perfil de sorção das polpas 7Pil/SAQ e 7Pil/AQ.

**Figura 31.** Imagens do licor negro precipitado do ensaio 5 (PilSAQ) e do licor negro emulsionado da duplicata 5 (PilSAQ).

**Figura 32.** Espectro FTIR das ligninas obtidas em escala piloto nas diferentes condições.

**Figura 33.** Porcentagem em massa da distribuição de cellulose, hemicellulose, arabinose e xylose nas correntes de saída (Polpa, Lignina sólida e Lavagem) de acordo com cada condição de reação.

**Figura 34.** Balanço de Massa da lignina (porcentagem) na polpa, lignina sólida, corrente de lavagem e perdas durante o pré-tratamento alcalino em escala piloto do bagaço de cana.

**Figura 35.** Conversão enzimática de celulose a glicose por tempo de reação para as diferentes polpas estudadas.

**Figura 36.** Correlação linear expressa pela isoterma de Langmuir [t/EC=1/ab+t/a].

**Figura 37.** Rendimento em glicose partindo de 1000 kg de bagaço, para cada condição experimentada em escala piloto.

**Figura 38.** Aspecto do material no inicio (0h) e ao final da reação de hidrólise (72h).

**Figura 39.** Apresentação dos hidrolisados e meio de fermentação para fermentação utilizando *S. cerevisiae* CAT-1.

**Figura 40.** Concentração de substratos e produtos por tempo na fermentação com *S. cerevisiae* CAT-1 para os diferentes hidrolisados testados. **A.** HE 5Pil/AQ; **B.** HE 5Pil/SAQ; **C.** HE 7Pil/AQ e **D.** HE 7Pil/SAQ.

**Figura 41**. Concentração de células, produto e substrato por tempo de fermentação para o hidrolisado e amostra controle.

**Figura 42**. Concentração de células (g/L) por tempo de fermentação para cada batelada. A concentração diminui nas primeiras 15 horas devido à alimentação do sistema.

**Figura 43.** Perfil de fermentação mostrando consumo de açúcares, massa de células (base seca, DCW) e produção de etanol (em g) para cada reciclo da fermentação em batelada alimentada com *S. stipitis*.

**Figura 44**. Subprodutos (glicerol, xilitol e ácido acético) formados em cada batelada para a fermentação com *S. stipitis*.

**Figura 45**. Leveduras floculadas ao fim da batelada de fermentação por *S. stipitis*.

**Figura 46**. Hidrolisado e o controle, suplementados e inoculados para a fermentação em *shaker* utilizando *S. passalidarum*.

**Figura 47**. Perfil de consumo de açúcares, massa seca de células e produção de etanol e xilitol para fermentação em *shaker* por *S. passalidarum*.

**Figura 48**. Perfil de fermentação mostrando consumo de açúcares, massa de células (base seca, MSC) e produção de etanol, em g, para cada reciclo da fermentação com *S.passalidarum*.

**Figura 49**. Formação de xilitol por batelada para a fermentação com cada uma das leveduras.

**Figura 50**. Metabolismo da xilose a xilulose mostrando cofatores envolvidos.

**Figura 51**. Consumo de glicose (A) e xilose (B) em cada batelada alimentada para fermentação com *S. passalidarum*.

**Figura 52.** Velocidade de consumo de carboidratos por batelada para fermentação por *S. passalidarum*.

**Figura 53**. Consumo de glicose (A) e xilose (B) em cada batelada alimentada para fermentação com *S. stipitis*.

**Figura 54.** Velocidade de consumo de carboidratos por batelada para fermentação por *S. stipitis*.

**Figura 55**. Velocidade específica de consumo de glicose [qs (gli)], velocidade específica de consumo de xilose [qs (xil)] e velocidade específica de produção de etanol [qp (EtOH)] (em g/gMSC.h) para *S. stipitis* (**A**) e *S. passalidarum* (**B**).

**Figura 56**. Fluxograma de comparação da obtenção de etanol por diferentes rotas.

**Figura 57.** Fluxograma resumido do setor 2G para o processo 2G Curto-prazo.

**Figura 58.** Fluxograma resumido do setor 2G para o processo 2G Vale.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Principais processos de pré-tratamento (adaptado de KUMAR, 2009).

**Tabela 2**. Volumes (mL) das soluções para a composição do meio de fermentação utilizado para fermentação por *S. stipitis*.

**Tabela 3**. Volumes (mL) das soluções para a composição do meio de fermentação utilizado para fermentação por *S. passalidarum.*

**Tabela 4.** Condições operacionais de pré-tratamento estudadas, porcentagem de solubilização de celulose, hemicelulose, lignina e conversão enzimática após pré-tratamentos com NaOH/AQ nas condições previstas no planejamento experimental.

**Tabela 5.** Rendimento em massa, média e desvios da composição para bagaço *in natura* e polpas obtidas nos pré-tratamentos.

**Tabela 6.** Solubilização dos principais constituintes.

**Tabela 7.** Inferências no Indice de Cristalinidade: Relação entre absorção de bandas do infravermelho e Largura de cristal determinadas por difração de raios-X.

**Tabela 8.** Parâmetros de sorção e dessorção obtidos pelo ajuste ao modelo de Hailwood-Horrobin.

**Tabela 9.** Poder calorífico superior (PCS) para os materiais analisados neste trabalho.

**Tabela 10.** Massas de lignina obtidas nos licores negros e águas de lavagem.

**Tabela 11.** Caracterização das ligninas obtidas nos ensaios estudados.

**Tabela 12.** Análise elementar, teor de metoxila e fórmula mínima (C9).

**Tabela 13.** Teor de metoxilas determinado por RMN-2D e Pirólise analítica.

**Tabela 14.** Teor de metoxilas por unidade C9 determinada pelos resultados de Pyr-CG/MS e fórmula mínima corrigida.

**Tabela 15.** Poder calorífico superior (PCS) para as ligninas obtidas.

**Tabela 16**. Balanço de massas considerenado os principais carboidratos e lignina dos pré-tratamentos realizados em escala piloto.

**Tabela 17.** Teor de celulose e xilana e porcentagem de conversão ao respectivo monômero para cada uma das polpas estudadas.

**Tabela 18.** Parâmetros cinéticos da correlação linear para a hidrólise enzimática.

**Tabela 19.** Comparação dos resultados em shaker e reator para a hidrólise enzimática da polpa do Ens.5Pil/AQ.

**Tabela 20**. Caracterização do hidrolisado proveniente da sacarificação enzimática da polpa 5Pil/AQ (130°C, 30 min, 1,5% m/v NaOH, 0,15% m/m AQ).

**Tabela 21**. Parâmetros de fermentação com *S. stipitis* para cada batelada alimentada.

**Tabela 22**. Resultados apresentados na literatura para produção de etanol por *S. stipitis*.

**Tabela 23**. Parâmetros de fermentação por *S. passalidarum* para cada batelada alimentada.

**Tabela 24**. Resultados apresentados na literatura para produção de etanol por *S. passalidarum*.

**Tabela 25.** Parâmetros utilizados para a construção das simulações - cenários 1G2G Curto-Prazo BNDES e 2G Vale.

**Tabela 26.** Comparação de resultados de simulação do processo Vale 2G e cenário 1G2G Curto-prazo BNDES.

# SUMÁRIO

1 Introdução e Justificativa ..... 19
2 Revisão Bibliográfica ..... 22
2.1 Biocombustíveis ..... 22
2.2 Materiais Lignocelulósicos ..... 24
2.3 Produção de etanol a partir de material lignocelulósico ..... 28
2.4 Tipos de pré-tratamento ..... 29
2.4.1 Pré-tratamento com NaOH e o uso da Antraquinona ..... 31
2.5 Hidrólise Enzimática ..... 35
2.5.1 Índice de Cristalinidade e técnicas de determinação ..... 39
2.6 Fermentação ..... 40
2.7 Ampliação de Escala ..... 42
3 Objetivo ..... 46
4 Materiais e Métodos ..... 47
4.1 Bagaço de cana ..... 47
4.2 Escala laboratorial - Planejamento fatorial $2^3$ do pré-tratamento com hidróxido de sódio e antraquinona. ..... 47
4.3 Ampliação de escala - Pré-tratamento alcalino em escala piloto ..... 47
4.4 Caracterização química do material lignocelulósico ..... 49
4.5 Infravermelho com transformada de Fourier ..... 53
4.6 Microscopia eletrônica de varredura ..... 53
4.7 Difratometria de Raios-X ..... 53
4.8 Sorção de Vapor Dinâmica ..... 54
4.9 Poder calorífico superior ..... 54
4.10 Análise elementar ..... 54
4.11 Balanço de Massa do Processo de Pré-tratamento ..... 55
4.12 Hidrólise enzimática da polpa ..... 56
4.12.1 Atividade enzimática ..... 58
4.13 Fermentação do Hidrolisado ..... 58
4.13.1 Fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 ..... 58
4.13.2 Fermentação em *shaker* com *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 ..... 60
4.13.3 Fermentação em Batelada alimentada com reciclo de células, utilizando *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 ..... 61
4.13.4 Fermentação em *shaker* com *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 ..... 62

4.13.5 Fermentação em Batelada alimentada com reciclo de células, utilizando *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 ..... 64
5 Resultados e Discussão ..... 66
5.1 Planejamento Experimental $2^3$ do pré-tratamento NaOH/AQ ..... 66
5.2 Pré-tratamento em escala piloto ..... 67
5.2.1 Fração sólida ..... 67
5.2.2 Fração Líquida ..... 92
5.2.3 Balanço de Massa ..... 101
5.2. Hidrólise Enzimática ..... 108
5.3 Fermentação ..... 115
5.3.1 Fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 ..... 115
5.3.2 Fermentação com *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 ..... 118
5.3.3 Fermentação com *Scheffersomyces stipitis* em batelada alimentada com reciclo de células ..... 120
5.3.4 Fermentação com *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 ..... 128
5.3.5 Fermentação com *Spathaspora passalidarum* em batelada alimentada com reciclo de células ..... 130
5.3.6 Comparativo da fermentação em batelada alimentada com reciclo de células por *Spathaspora passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis* ..... 137
5.4 Avaliação da viabilidade técnica industrial preliminar do processo de obtenção de etanol 2G. ..... 149
6 Conclusões ..... 155
Sugestões para trabalhos futuros ..... 156
Referências ..... 157
Apêndice . ..... 173

# 1 Introdução e Justificativa

No Brasil, o etanol é considerado a melhor escolha para reduzir a dependência de combustíveis fósseis. Entretanto, com a crescente preocupação em produzir de forma sustentável e ambientalmente correta, a produção de etanol terá que aumentar de forma considerável.

Muitas são as ações a serem tomadas para o aumento da produção de etanol como o aumento da área de plantio, aperfeiçoamento do processo de produção, melhoramento genético da cana e dos microrganismos fermentadores, e entre estas, o desenvolvimento de tecnologias de conversão de resíduos agroindustriais lignocelulósicos em fontes de açúcares fermentáveis (DIAS et al, 2011; SOCCOL *et al.*, 2010). Essas tecnologias levam ao chamado etanol de segunda geração, que é apontado como uma das alternativas mais promissoras e ambientalmente sustentáveis para substituir combustíveis fósseis (LYND *et al.*, 2008), principalmente no Brasil, onde há grande quantidade de biomassa disponível, como o bagaço e a palha de cana, resultantes do processamento da cana-de-açúcar na a produção de açúcar e etanol.

Essa biomassa em geral é queimada para produção de energia elétrica, mas há um excedente que pode ser utilizado como fonte de carbono para a produção do etanol de segunda geração. Isso aumentaria a eficiência de processo e, consequentemente, a competitividade do etanol produzido (SILVA *et al.*, 2010; BUDDADEE *et al.*, 2008).

De acordo com Soares e Rossell (2007), os custos de produção de biomassa no Brasil são os menores do mundo, portanto, a possibilidade de resultados viáveis é alta. Além desse fator, a produção de etanol celulósico tem como perspectiva aumentar em até 50% a produção de álcool sem necessidade de expandir a área de plantio (SILVA *et al.*, 2010).

O processo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos demanda a transformação da celulose em monômeros de glicose e subsequente conversão, por microrganismos, em etanol. Entretanto, a recalcitrância da celulose nativa protegida pela matriz lignina-carboidrato, resulta em processos hidrolíticos lentos e de baixa conversão sendo necessário realizar um pré-tratamento do material lignocelulósico para aumentar a exposição das fibras de celulose, tornando-as mais acessíveis aos agentes hidrolíticos.

O pré-tratamento consiste em uma das etapas operacionais mais relevantes em termos de custo direto, além de influenciar consideravelmente os custos das etapas anteriores e subsequentes do processo.

Vários métodos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas têm sido sugeridos ao longo das duas últimas décadas. Em relação a sua natureza, estes podem se classificar em três grupos principais: físicos, químicos, biológicos, além de uma possível combinação entre eles (AGBOR *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2009).

A evolução da eficiência dos pré-tratamentos tem sido baseada no rendimento de hidrólise após esta etapa, em função da qual se determina experimentalmente a condição ótima de operação em cada caso. Embora muitos métodos de pré-tratamento tenham sido alvos de pesquisas ao longo dos últimos anos, constata-se a crescente necessidade de desenvolver alternativas tecnológicas eficientes em termos de custo global e competitividade econômica.

Pré-tratamentos que combinam métodos físicos e químicos têm sido apontados na literatura como os mais eficientes, destacando-se explosão a vapor (uso de vapor saturado) que se apresenta como um dos métodos mais promissores para a implementação industrial (PITARELO *et al.*, 2012; RAMOS; SADDLER, 1994).

Porém, os métodos alcalinos também têm recebido grande atenção por serem considerados relativamente baratos, com um menor gasto energético, além de serem bastante eficazes para aplicações em resíduos agrícolas, como o bagaço de cana-de-açúcar (McINTOSH; VANCOV, 2011; KESHWANI; CHENG, 2009; SCHMER *et al.*, 2008).

A aplicação de soluções alcalinas leva à remoção acentuada de lignina, perturbação de ligações estruturais, redução da cristalinidade da celulose, e diminuição do grau de polimerização dos carboidratos (McINTOSH; VANCOV, 2011; MOSIER *et al.*, 2005). O hidróxido de sódio é o mais efetivo dos reagentes alcalinos e tem sido utilizado para tratar uma grande variedade de biomassas lignocelulósicas (XU *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007; SHARMAS *et al.*, 2002; SOTO *et al.*, 1994).

Estudos mostram que na presença de açúcares redutores e reagentes alcalinos, a adição de antraquinona (AQ) ao meio de pré-tratamento conduz a uma estabilização da degradação alcalina da celulose (peeling) já que promove a formação de ácido aldônico nos grupos terminais dos polissacarídeos (REGUANT *et al.*, 1997). Isso faz com que haja uma preservação da estrutura desse polímero e acabe favorecendo apenas a degradação da lignina (HEDJAZI *et al.*, 2009; SCHENCK *et al.*, 2013).

Com o objetivo de contribuir para desenvolvimento da tecnologia para produção industrial do etanol de segunda geração, este projeto analisou os problemas associados à ampliação de escala, contando com a infraestrutura da Planta Piloto para Desenvolvimento de Processos (PPDP) do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), onde foram testados processos de pré-tratamento. Este projeto encontra-se inserido como uma das metas do projeto: "Biodiversidade para Produção de Etanol de Segunda Geração" (PITE - FAPESP/ VALE S/A/ UFPA/ CNPEM, Processo: 10/51309-3) da Rede de exploração do bioma da Amazônia para desenvolvimento de tecnologias de produção de etanol de segunda geração.

# 2 Revisão Bibliográfica

## 2.1 Biocombustíveis

A demanda de energia em todo o mundo tem aumentado rapidamente devido ao crescimento e a propagação da industrialização, levando à degradação ambiental e climática causada pelas emissões de gases do efeito estufa e poluentes (PARK *et al*, 2010).

As fontes de energia de origem fóssil são dominantes no mercado mundial sendo utilizada em sua grande parte como combustível, principalmente no setor de transporte. A queima destes combustíveis é responsável por 73% das emissões de dióxido de carbono ($CO_2$), um dos principais gases relacionados com o efeito estufa (HOEL; KVERNDOKK, 1996; WILDENBORG; LOKHRORST, 2005).

As preocupações com a segurança energética, econômica e questões ambientais em virtude da demanda de energia do mundo e a incerteza no fornecimento tem levado a esforços de pesquisa intensa, visando à produção de combustíveis renováveis (PEREIRA *et al.*, 2015).

A importância da biomassa se evidencia pela utilização de seus derivados como álcool, gás de madeira, biogás e óleos vegetais nos motores de combustão. Atualmente, os recursos de biomassa são extremamente promissores uma vez que, em geral, são matérias-primas disponíveis em abundância e de baixo custo.

O Brasil é destaque mundial no uso de energias renováveis, que representam mais de 40% da matriz energética do país. Possuindo o setor sucroenergético papel chave nesta participação, uma vez que somente os produtos da cana-de-açúcar (considerando etanol e bagaço para cogeração de eletricidade) são responsáveis por 16,9% de toda a oferta de energia do país. Valor que já ultrapassa o fornecido pelas usinas hidroelétricas, segundo dados da Empresa de Pesquisa Energética do Ministério de Minas e Energia (Figura 1).

Diversos estudos mostram que, quando comparado com a gasolina, o etanol brasileiro reduz as emissões dos chamados gases de efeito estufa (GEE) em até 90% em relação à gasolina (TURDERA, 2013; WALTER *et al.*, 2011).

**Figura 1.** Repartição das ofertas de energia interna

Fonte: (BRASIL, 2016).

O etanol de cana-de-açúcar também apresenta um balanço energético extremamente favorável, nove unidades de energia renovável gerada para cada unidade de energia fóssil consumida no processo (GOLDEMBERG, 2008).

No Brasil, o potencial da cana-de-açúcar e os novos usos de seus produtos não param de crescer. Assim como também não param de crescer a demanda por energia e a preocupação em produzir de forma sustentável e ambientalmente correta, sendo necessário aumentar de forma considerável sua produtividade. O etanol de primeira geração requer a utilização de produtos agrícolas como matéria-prima (sacarose de cana-de- açúcar e amido de milho, por exemplo), enquanto o etanol de segunda geração utiliza resíduos agrícolas e agroindustriais (celulose e hemicelulose do bagaço e palha de cana-de-açúcar, por exemplo) como insumo na produção de biocombustíveis.

Para cada tonelada de cana processada são gerados aproximadamente 140 kg de bagaço seco e também 140 kg de palha seca (SEABRA, 2008; DIAS *et al.*, 2009), material lignocelulósico disponível para obtenção do etanol de segunda geração.

Grande parte do bagaço é aproveitada como fonte energética dentro da própria usina. Atualmente, as usinas são autossuficientes em energia e algumas delas possuem o sistema de cogeração (pela qual é possível obter energia elétrica e térmica). Mesmo com o autoconsumo ainda há excedentes.

Para compreender como o bagaço e a palha podem ser utilizados para produção de etanol, é necessário um conhecimento mais detalhado de sua composição.

## 2.2 Materiais Lignocelulósicos

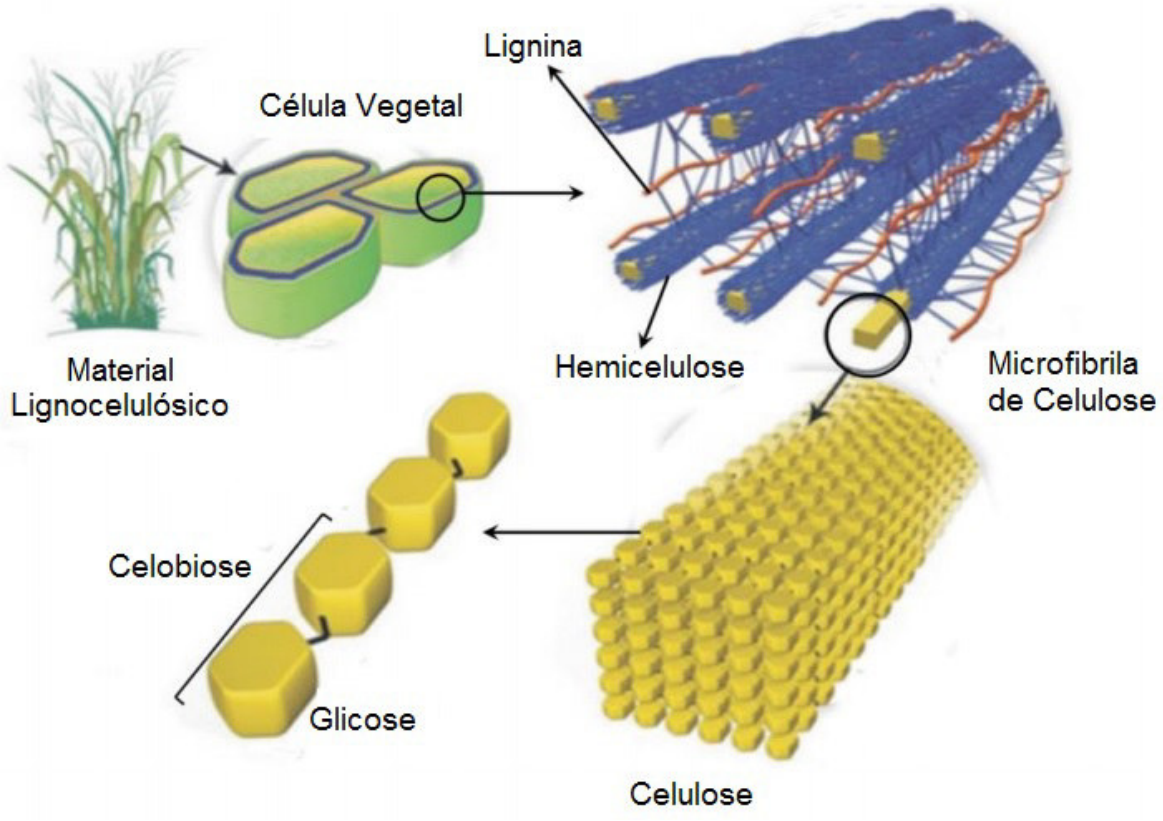
A palha e o bagaço de cana-de-açúcar são materiais lignocelulósicos, que possuem em sua composição química celulose, hemicelulose, lignina, e outros materiais presentes em menor quantidade que correspondem aos extrativos, proteínas, cinzas inorgânicas e ácidos graxos. A proporção de cada um destes componentes varia de acordo com a espécie, disposição e sazonalidade da planta (FENGEL; WEGENER,1989).

Os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura lamelar, complexa e compacta, em que a celulose e a hemicelulose predominam na região da parede celular e a lignina se distribui por toda a estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média. Geralmente, a estrutura da parede celular vegetal é subdividida em lamela média, parede primária, parede secundária S1, S2 e S3. A distribuição da celulose, da hemicelulose e da lignina varia consideravelmente entre essas camadas (FENGEL; WEGENER,1989).

A celulose é um dos mais importantes polímeros naturais existentes e é a maior constituinte das plantas, respondendo por aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera. É um polímero linear constituído por unidades de glicose, ligadas por uma ligação glicosídica do tipo β 1-4, sendo a celobiose a unidade repetitiva do polímero. Cada unidade de glicose possui três hidroxilas livres ligadas aos carbonos 2, 3 e 6. Devido à disponibilidade destes grupos hidroxilas, as macromoléculas de celulose tendem a formar ligações de hidrogênio intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes) e intramoleculares (entres unidades de glicose da mesma molécula), as quais são extremamente importantes para suas características químicas e físicas (PORTUGUÊS, 2004).

A Figura 2 mostra uma representação esquemática das associações químicas que ocorrem na parede celular vegetal. A estrutura da celulose está organizada em fibrilas que são envoltas por uma matriz formada de lignina e hemicelulose.

**Figura 2.** Representação esquemática das associações químicas que ocorrem na parede celular vegetal.

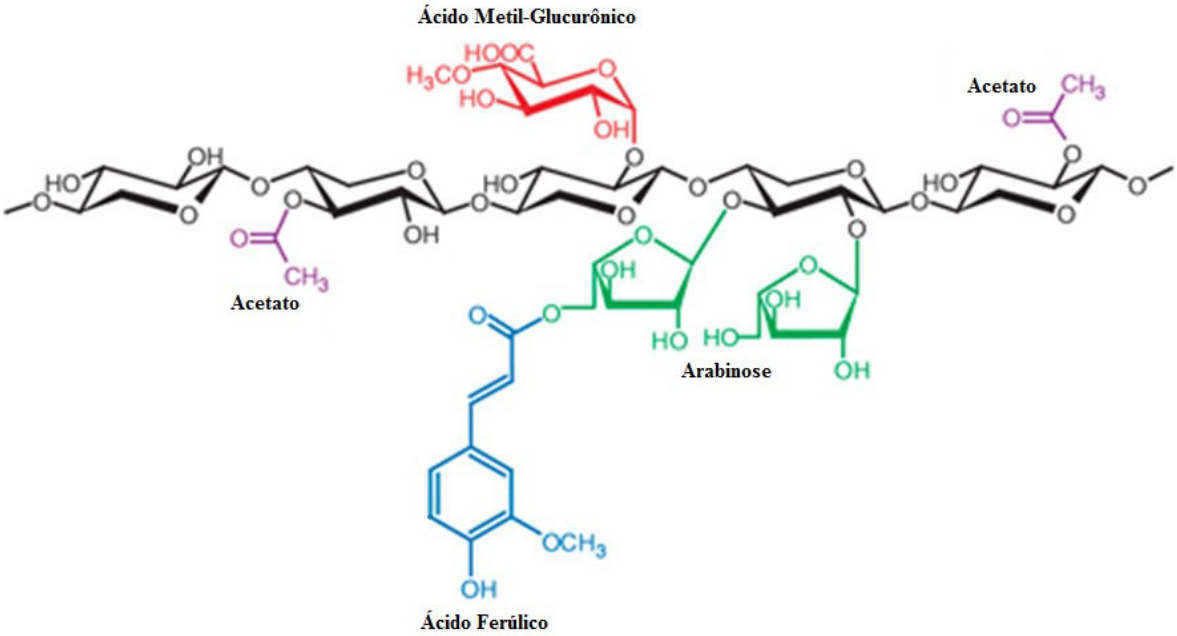



Fonte: SANTOS F. *et al.*, 2012 (Adaptado)

A hemicelulose difere substancialmente da celulose por ser amorfa, com estrutura ramificada e composta pela combinação de vários açúcares (pentoses, hexoses e ácidos hexurônicos). A hemicelulose é classificada de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas, glucomananas e galactanas. O teor de hemicelulose em diferentes tipos de vegetais é bastante variável, com um valor médio de 20% (FENGEL; WEGENER, 1989).

Devido à combinação de diversos açúcares e por ser uma molécula amorfa, a hemicelulose é mais solúvel em água e mais fácil de ser degradada que a celulose e a lignina. Uma representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas se encontra na Figura 3.

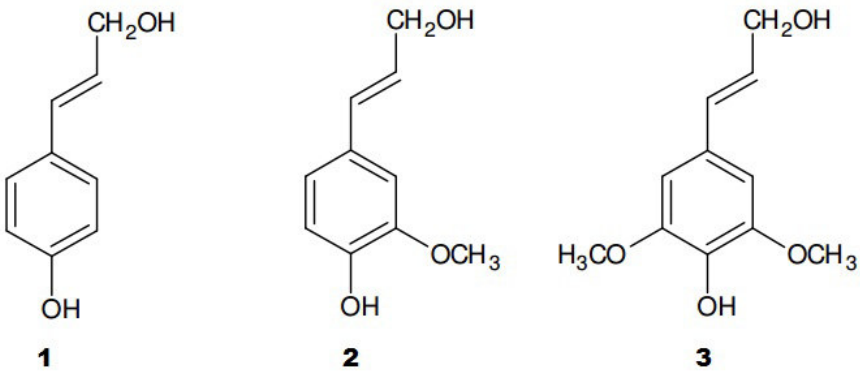
**Figura 3.** Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes.




Fonte: DODD; CANN, 2009 (Adaptado).

A lignina é uma macromolécula altamente complexa e ramificada, gerada pela polimerização desidrogenativa, iniciada por enzimas, a partir de álcoois hidroxinamílicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapilíco) (Figura 4). A copolimerização desses álcoois produz uma macromolécula heterogênea de alta massa molar, opticamente inativa e polidispersa.

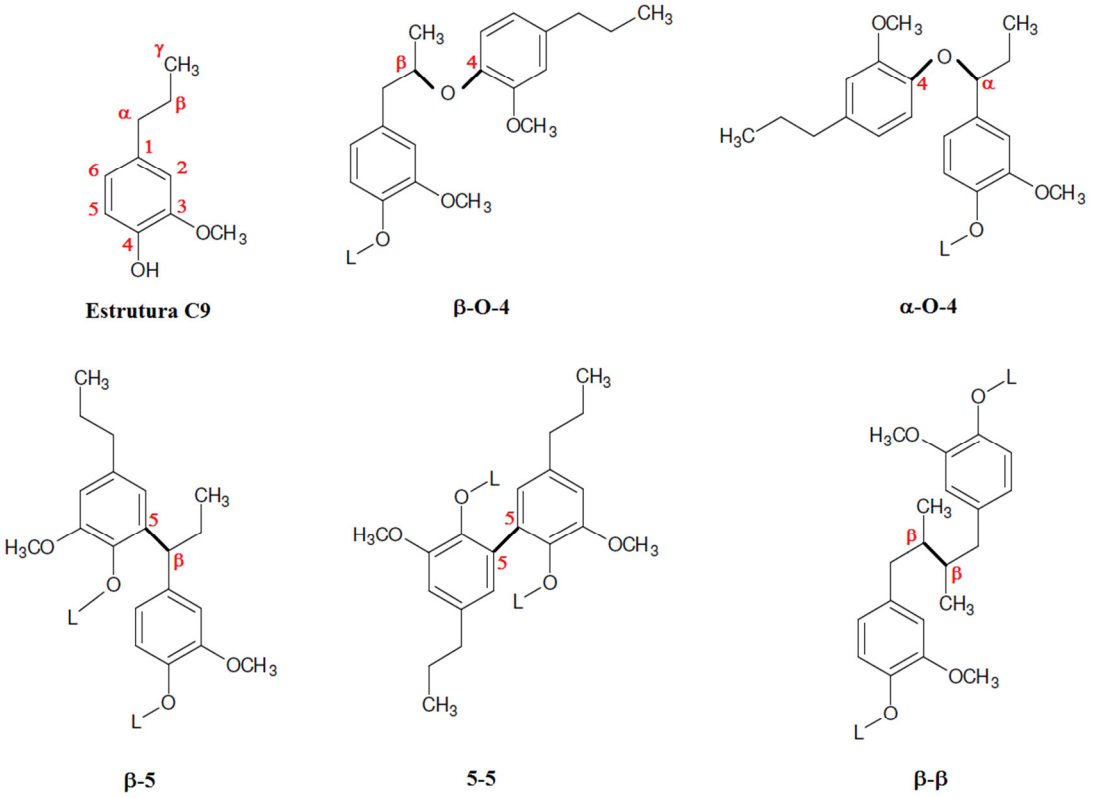
**Figura 4.** Unidades fenilpropano precursoras da lignina




1. Álcool p-cumarílico; 2. Álcool coniferílico; 3. Álcool sinapílico.
Fonte: (FENGEL; WEGENER, 1989).

A lignina é composta basicamente de unidades fenilpropano, chamadas unidades C9, formando uma macromolécula tridimensional amorfa, que representa 20 - 30% da massa total dos materiais lignocelulósicos. Atua como uma camada protetora das microfibrilas de celulose, agindo como uma cola e conferindo coesão ao conjunto de células. A estrutura da lignina é atribuída ao seu mecanismo de biossíntese, que se processa por via radicalar a partir de seus precursores. Vários tipos de ligações são formados entre as unidades fenilpropano, sendo as mais abundantes as β–O-4 e α–O-4 (50 – 65 %), β-5 (6 – 15 %), β-1 (9 –15%), 5-5 (8 – 9 %) e β–β (2 - 5 %). A Figura 5 mostra uma unidade C9 com a nomenclatura dos carbonos e algumas das principais ligações de lignina.

**Figura 5.** Estrutura fenilpropano e principais ligações de lignina.



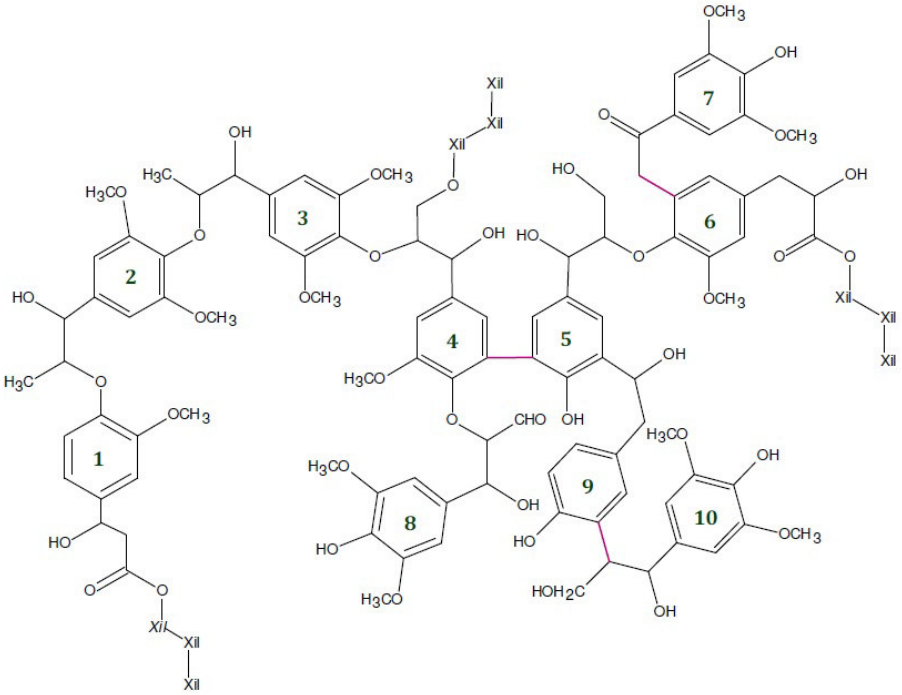

Fonte: Gambarato, 2014 (adaptado).

Várias estruturas para diferentes tipos de lignina foram propostas na literatura. Gambarato (2014) num estudo de isolamento e caracterização de ligninas de palha de cana propõe uma estrutura média para a lignina de palha obtida por acidólise (Figura 6).

Existem ainda numerosas substâncias junto aos componentes da parede celular que são chamadas de materiais acidentais ou estranhos aos materiais lignocelulósicos. Estes materiais são responsáveis muitas vezes por certas propriedades, tais como: cheiro, cor,

gosto. Também possuem um papel importante na proteção contra pragas e no metabolismo das plantas, mas não têm uma contribuição positiva aos processos de conversão de biomassa e sim um efeito inibitório. Estas substâncias pertencem a classes muito diferentes em termos de composição química e, portanto, há dificuldades em se encontrar um sistema claro e compreensivo de classificação, sendo divididos de forma geral em material orgânico (extrativos) e inorgânico (cinzas) (FENGEL; WEGENER, 1989; KLOCK; MUÑIZ, 1998).

**Figura 6.** Esboço da estrutura média da lignina de palha de cana obtida por acidólise.




Fonte: Gambarato, 2014.

## 2.3 Produção de etanol a partir de material lignocelulósico

A produção de etanol de segunda geração, a partir do material lignocelulósico, envolve basicamente três etapas: (I) hidrólise, com a adição de enzimas ou de um catalisador ácido, para liberar os açúcares monoméricos; (II) fermentação, para converter açúcares em etanol; e, (III) destilação para a recuperação do produto (SINGH *et al*., 2014; RABELO *et al*., 2011). Contudo, a etapa (I) realizada por meio de um catalisador ácido, pode levar a degradação dos açúcares liberados, formando inibidores para a etapa posterior. Já a etapa (I) realizada por via enzimática não é eficiente quando aplicada ao material lignocelulósico *in natura*, devido à recalcitrancia do

material. Assim, uma etapa prévia, denominada pré-tratamento, geralmente é realizada para tornar a celulose mais acessível aos agentes hidrolíticos.

## 2.4 Tipos de pré-tratamento

Vários métodos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas têm sido sugeridos ao longo das duas últimas décadas. Em relação a sua natureza, estes podem se classificar em três grupos principais: físicos, químicos, biológicos, além de uma possível combinação entre eles (MOOD *et al.*, 2013; AGBOR *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2009).

A escolha do processo de pré-tratamento ideal depende muito do objetivo do pré-tratamento e da biomassa utilizada, uma vez que produtos diferentes são gerados. Além disso, a escolha de um método de pré-tratamento não deve basear-se apenas no seu rendimento potencial, mas também de outros parâmetros importantes, tais como o sua avaliação econômica e impacto ambiental. A Tabela 1 abaixo mostra as vantagens e as limitações dos principais processos de pré-tratamentos estudados.

**Tabela 1.** Principais processos de pré-tratamento (adaptado de KUMAR, 2009).

| Pré-tratamento | Vantagens | Desvantagens e limitações |
|---|---|---|
| **Moagem** | Redução da cristalinidade da celulose. | Consumo de energia geralmente superior à energia inerente biomassa. |
| **Explosão a Vapor** | Degrada hemicelulose e transforma lignina; rentável. | Destruição de uma parte da fração de xilana; ruptura incompleta da matriz lignina-carboidrato; gera compostos inibidores. |
| **AFEX (Ammonia Fibre Expansion)** | Aumenta a área de superfície acessível; retira extensivamente lignina e hemicelulose; não produz inibidores de processos subsequentes. | Não eficiente para biomassa com alto teor de lignina. |
| **Ozonólise** | Reduz o teor de lignina; não produz resíduos tóxicos. | Custo elevado; requer grande quantidade de ozônio. |
| **Hidrólise ácida** | Hidrolisa hemicelulose a xilose e outros açúcares; altera a estrutura da lignina. | Custo elevado, corrosão de equipamento, formação de tóxicos. |
| **Tratamento alcalino** | Remove hemicelulose e lignina; aumenta a área de superfície acessível. | Tempo elevado de reação, formação de sais incorporados a biomassa. |
| **Organossolve** | Hidrolisa lignina e hemicelulose. | Custo elevado, solvente precisa ser recuperado. |
| **Biológico** | Degrada a lignina e hemicelulose; baixo gasto energético. | Taxa de conversão muito baixa. |

O objetivo de pré-tratamentos físicos, tais como a moagem, trituração e radiação é aumentar a área da superfície e reduzir o tamanho de partícula. Além disso, esses tratamentos levam à diminuição do grau de polimerização e redução da cristalinidade da matéria-prima. São usados geralmente combinados a outros pré-tratamentos (BEHERA *et al*., 2014; HARUN *et al.*, 2011).

A explosão a vapor é o tratamento mais usado e estudado para biomassa, sendo um dos poucos que já se apresenta em escala comercial. Nesse tratamento, a biomassa é aquecida por vapor saturado a altas pressões por um curto período de tempo, e a reação termina com a súbita abertura do reator, levando a uma explosiva descompressão da biomassa. Durante o processo, a hemicelulose é hidrolisada por ácidos orgânicos, principalmente o ácido acético, formado pela quebra de grupos acetil presentes na própria hemicelulose, por isso esse processo também é conhecido como auto-hidrólise (ROCHA *et al.,* 2012 b).

Pré-tratamentos ácidos removem a maior parte da hemicelulose e uma pequena porção de lignina, porém podem gerar compostos como furfural e hidroximetilfurfural, que podem prejudicar a hidrólise enzimática ou a fermentação para a obtenção de etanol (PERSSON *et al.*, 2009; RANJAN *et al.*, 2009). Pré-tratamento ácido pode ser realizado com baixa concentração de ácido e temperatura elevada ou maior concentração de ácido e temperatura mais baixa. Usar o ácido concentrado é mais econômico já que o processo é realizado a baixa temperatura; no entanto, a toxicidade, a corrosividade dos equipamentos, a recuperação do ácido, a degradação dos monossacarídeos glicose, e a produção de inibidores de fermentação, são os principais inconvenientes que impedem a aplicação generalizada deste método. Industrialmente, o ácido diluído é mais atraente, uma vez que gera menor quantidade de inibidores da fermentação.

Pré-tratamentos realizados apenas com água quente, removem grande parte da hemicelulose, mas deixam a maior parte da lignina intacta (MOSIER et al., 2005; YANG; WYMAN, 2008). Nesse tipo de tratamento, chamados hidrotérmicos (no inglês: Liquid Hot Water - LHW), utiliza-se pressão para manter a água no estado líquido a altas temperaturas. Baseia-se no mesmo princípio da auto-hidrólise que a explosão a vapor, mas tem como vantagens a maior recuperação pentoses com baixa formação de compostos de degradação de açúcar, que são inibidores de fermentação (ZHENG et al., 2009).

Pré-tratamentos alcalinos removem uma grande fração de lignina e parte da hemicelulose, com baixa formação de inibidores da fermentação, sendo uma alternativa de baixo custo para solubilização da lignina (KUMAR et al., 2009). A solubilização de

hemicelulose e celulose neste método é menor do que em processos ácidos ou hidrotérmicos (MOOD *et al*., 2013).

Este método também é conhecido por causar inchaço químico da fibra de celulose, ocorrendo a saponificação das ligações ester intermoleculares que reticulam a lignina e os carboidratos, aumentando assim a porosidade da biomassa. Comparativamente, o pré-tratamento alcalino é operado a temperaturas mais baixas e não necessita de reatores complexos, como os necessários quando se utiliza ácido. No entanto, os maiores inconvenientes são o longo tempo de residência (de horas a dias) e a necessidade de neutralização da suspensão de pré-tratado. Hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) , e amônia são os principais alcalis usados neste método de pré-tratamento (BEHERA *et al.*, 2014).

### 2.4.1 Pré-tratamento com NaOH e o uso da Antraquinona

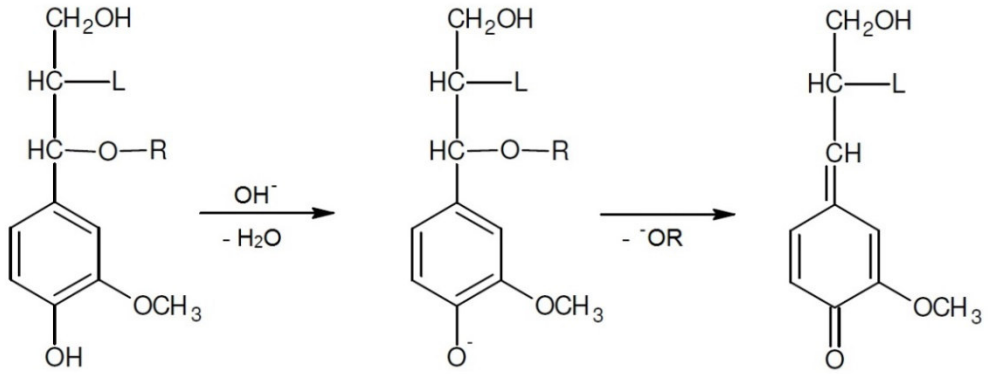
O pré-tratamento alcalino de materiais lignocelulósicos é uma metodologia de deslignificação que vem dos processos de polpação de madeira da indústria de papel e celulose.

O tratamento de materiais lignocelulósicos utilizando NaOH foi desenvolvido na Inglaterra por Burges e Watts para a obtenção de polpa celulósica, como uma alternativa à polpação kraf, a qual produz odores (mercaptanas) indesejaveis e tóxicos durante o processo (MINOR, 1996). A ação alcalina nesse processo é atribuída a uma saponificação da ligação éster que separa a hemicelulose da lignina. Além disso, o tratamento da biomassa com uma solução de NaOH provoca um inchamento interno na estrutura da celulose e consequentemente, aumenta a área superficial. O inchamento reduz a interação entre a lignina e os carboidratos, causando ainda, rompimento na estrutura da lignina que é solúvel nessas condições (WEIL *et al.*, 1994).

As reações de lignina se baseiam em dois principais mecanismos: a condensação e a clivagem alcalina (VILLAQUIRÁN, 1987: FENGEL; WEGENER, 1989). A primeira é indesejável porque diminui o poder de remoção da lignina, formando uma estrutura rígida difícil de ser solubilizada no licor de polpação. Já através da clivagem alcalina, o NaOH ataca a lignina rompendo essa macromolécula em unidades de baixa massa molecular que são solúveis no licor. As reações de lignina no meio alcalino geralmente tem início na

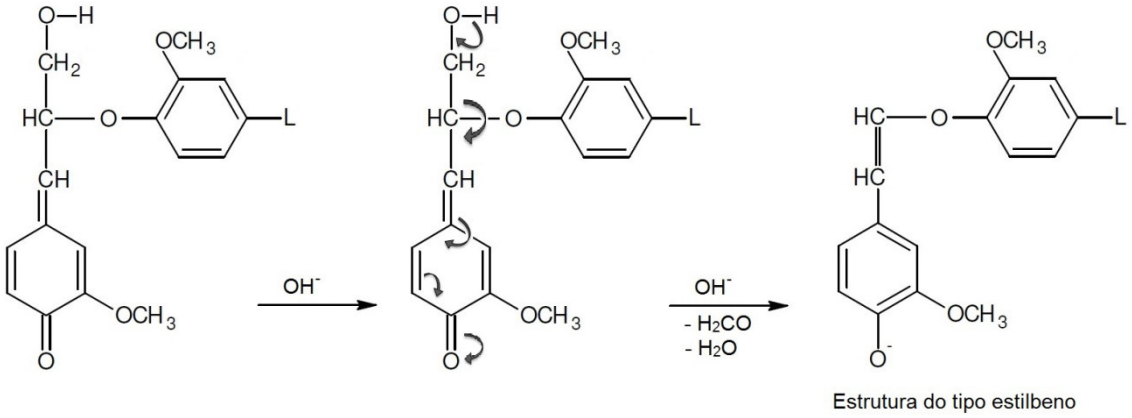
desprotonação do OH fenólico, dando origem a uma metileno quinona, através da clivagem carbono alfa (Figura 7) ou a estruturas do tipo estilbeno por eliminação do carbono gama (Figura 8).

**Figura 7.** Mecanismo de degradação da lignina em meio alcalino com eliminação no carbono alfa.




Fonte: (FENGEL; WEGENER, 1989).

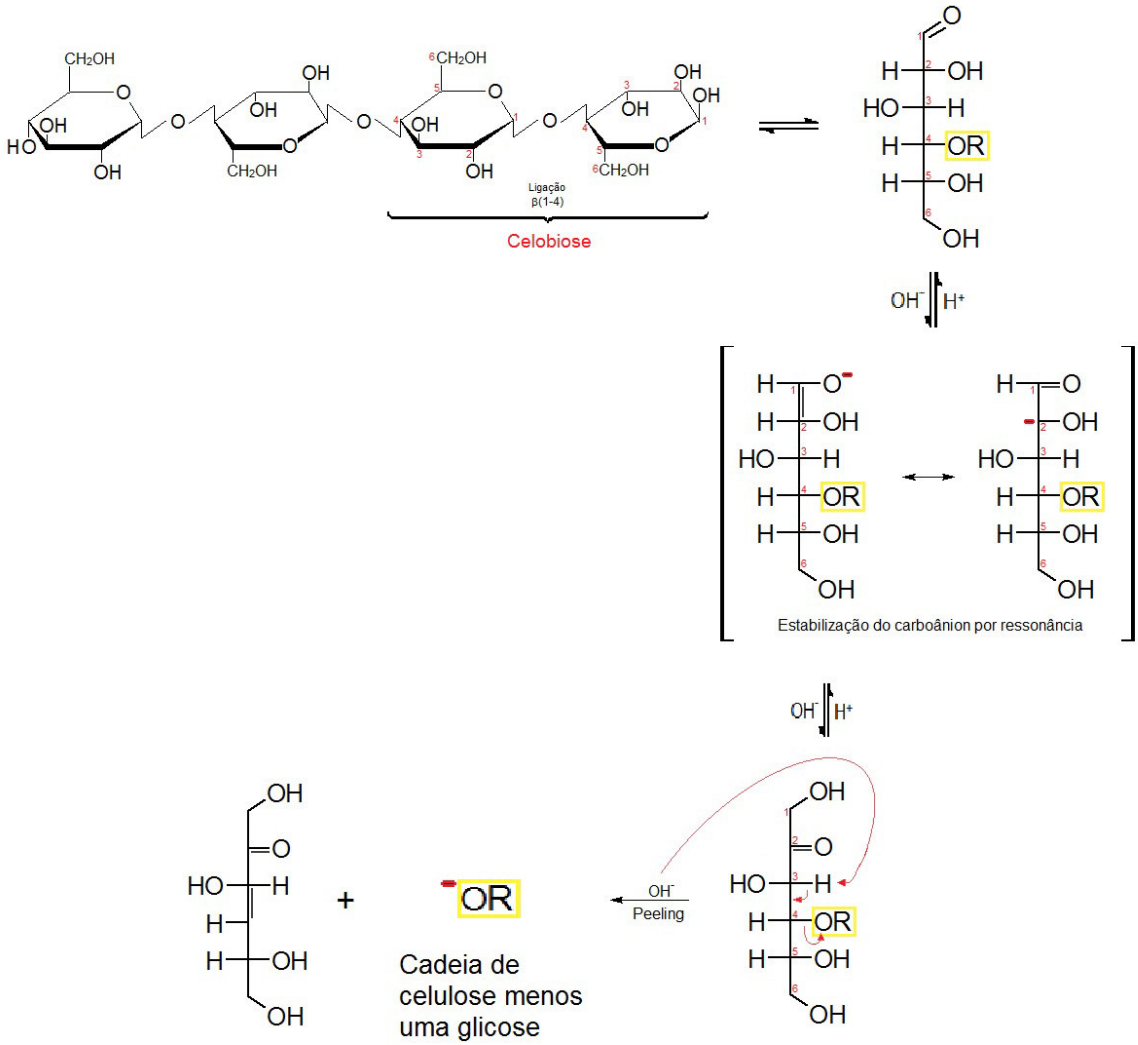
**Figura 8.** Mecanismo de degradação da lignina em meio alcalino com eliminação no carbono gama.




Fonte: (FENGEL; WEGENER, 1989).

No entanto, se a reação for realizada sob condições agressivas, a celulose é muito degradada, diminuindo o rendimento. Nestas condições a celulose pode sofrer hidrólise alcalina, conhecidas como reações de peeling (Figura 9).

**Figura 9.** Mecanismo da reação de peeling.




Fonte: (Adaptado de KOCUREK *et al*., 1983).

As reações de peeling são indesejáveis pelas seguintes razões: (1) a hidrólise alcalina promove a cisão da cadeia polimérica, decrescendo drasticamente o comprimento médio da cadeia; (2) nas reações de peeling, as unidades de açúcar com extremidades redutoras das cadeias de polissacarídeos são removidas e, além da perda de açúcares, os carboidratos removidos são convertidos em diversos ácidos orgânicos hidroxilados, os quais reduzem a concentração de álcali efetivo no licor de cozimento (BERGGREN *et al.*, 2003).

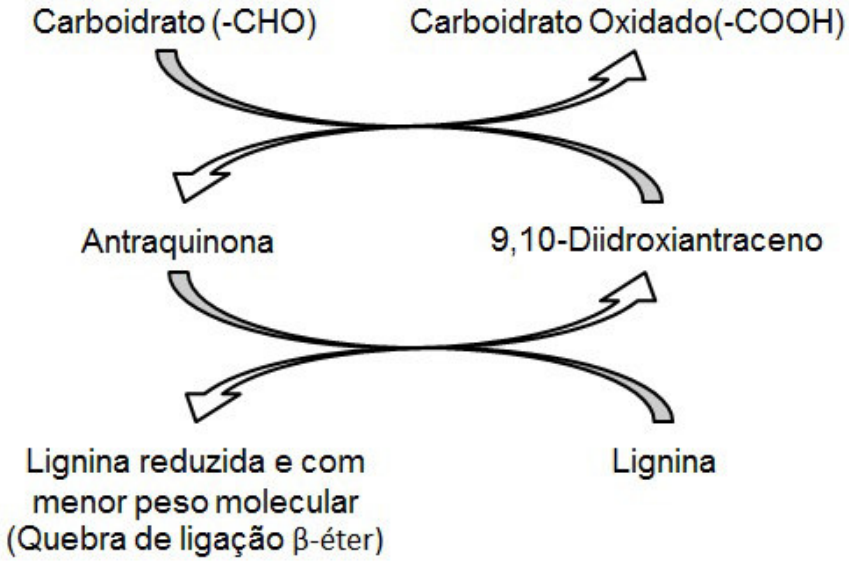
Como resultado, a reação de peeling provoca uma redução rápida na massa molar da celulose. Esse mesmo tipo de reação também é a responsável pela degradação da hemicelulose em meio alcalino. Existem dois tipos de reações de peeling, o primário que ocorre a temperaturas ao redor de 100ºC e ataca o terminal redutor e o secundário que

desprotona a hidroxila do carbono 2, gerando novos terminais redutores que então são susceptíveis às reações de peeling primário. A reação de peeling secundário ocorre a temperaturas acima de 150°C (FENGEL; WEGENER, 1989). Para evitar tais perdas e obter polpas com qualidade equivalente a polpas do processo Kraft, costuma-se adicionar um composto orgânico na forma de pó chamado antraquinona (AQ).

A utilização de antraquinona como aditivo em processos alcalinos de produção de celulose, data da segunda metade da década de setenta (HOLION; CHAPMAN, 1977), quando se descobriu que sua presença, mesmo em baixas dosagens, propiciava incremento na taxa de deslignificação, além de um aumento em rendimento, resultando em menores teores de lignina residual na polpa marrom. A polpação NaOH/AQ é um processo de reação heterogênea complexa.

A Figura 10 mostra o mecanismo de ação da antraquinona proposto por Gomide e Oliveira (1979) como um sistema redox da antraquinona com os polissacarídeos e a lignina. A antraquinona estabiliza os polissacarídeos da celulose, oxidando seus grupos terminais redutores para ácidos aldônicos, sendo por isso, reduzida. A forma reduzida faz uma adição nucleofílica na quinona metíde intermediária do tipo éter β-aril da lignina, promovendo a ruptura dessa ligação e recuperando a antraquinona na forma oxidada.

**Figura 10.** Mecanismo de ação da antraquinona.




Fonte: (GOMIDE; OLIVEIRA, 1979) adaptado.

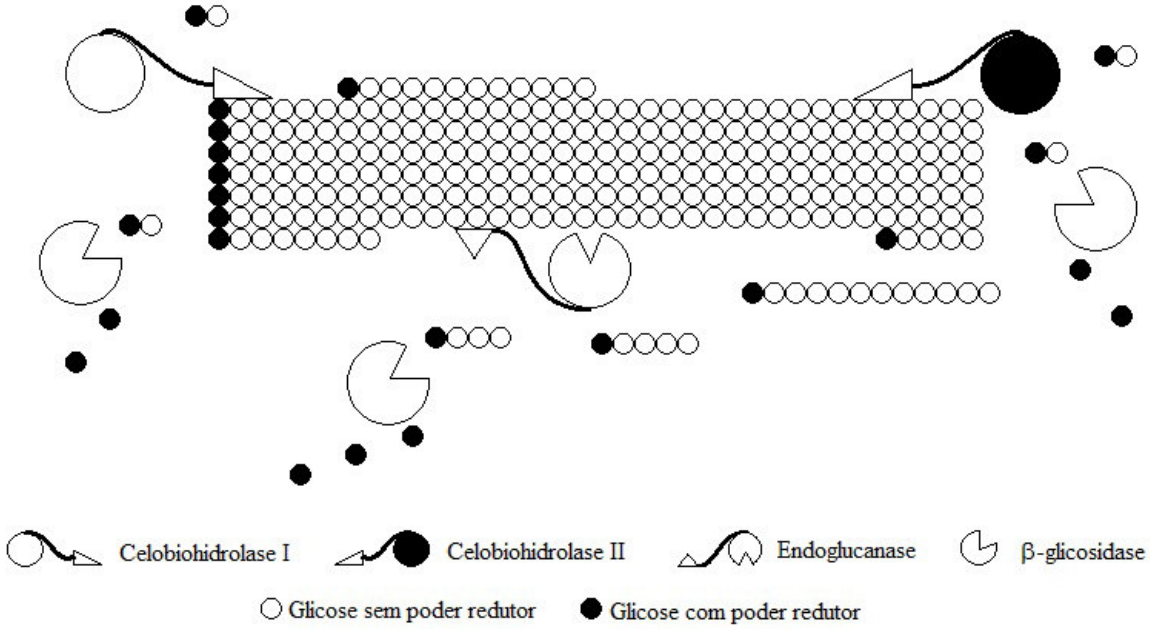
## 2.5 Hidrólise Enzimática

Uma eficiente hidrólise da celulose requer uma ação sinérgica de enzimas, divididas em três grupos principais:

- exo-1,4-β-D-glucanases, ou celobiohidrolases (CBH), que se movem progressivamente na cadeia de celulose e liberam unidades de celobiose;
- endo-1,4-β-D-glucanases, que clivam aleatoriamente no interior da cadeia e;
- 1,4-β-D-glicosidases, ou celobiases, que hidrolisam a celobiose em glicose, além de clivarem celuoligossacarídeos.

Os três grupos catalisam a hidrólise de ligações β-1,4 glicosídicas e atuam sinergicamente, criando novos sítios para hidrólise e reduzindo a inibição pelo produto (Figura 11) (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2009; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

**Figura 11.** Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico




Fonte: Adaptado de Castro e Pereira Jr., 2010.

A celobiose, que é o produto da ação da celobiohidrolase inibe a ação da endoglucanase e da própria celobiohidrolase. A presença de β-glicosidase agindo em conjunto diminui essa inibição pelo produto (LYND *et al.*, 2002). As celobiohidrolases e

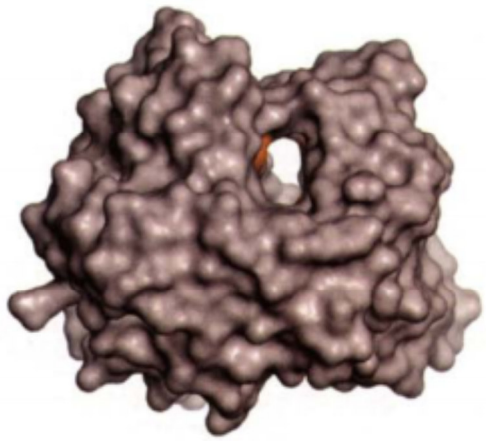
as endoglucanases também são inibidas por xilobiose e xilooligômeros (BHAT; HAZLEWOOD, 2001).

Como a celulose é um polímero insolúvel em meio aquoso, as enzimas do complexo celulolítico necessitam de um sítio especial para sua adsorção na molécula, permitindo a ação do domínio catalítico. Esse domínio, chamado de domínio de ligação à celulose (CBD) está presente tanto nas exoglucanases quanto nas endoglucanases (ZHANG; LYND, 2004). As celobiases não possuem esse domínio (SIPOS *et al.*, 2010).

Existem dois tipos de exoglucanases, as CBH I e CBH II, representando 60 e 20% das celulases respectivamente, e diferenciam entre si principalmente pelo mecanismo de ação. As CBH I atuam preferencialmente na extremidade redutoras da cadeia, ao passo que a CBH II hidrolisa a extremidade não redutora (LYND *et al.*, 2002).

A Figura 12 mostra o túnel catalítico da exoglucanase CBH II de *Trichoderma reesei*. Esse túnel promove a clivagem progressiva da cadeia de celulose, permitindo que a enzima deslize pela molécula.

**Figura 12**. CBH II de *T. reesei*, mostrando o túnel catalítico de 20 Å

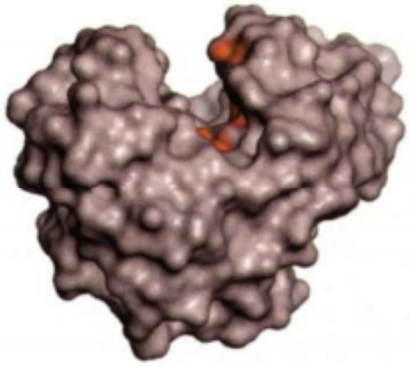


Fonte: (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

As endoglucanases atuam no interior da cadeia de celulose amorfa, gerando novas extremidades susceptíveis à ação das celobiohidrolases. Como as endoglucanases tem a possibilidade de atuar em mais regiões da cadeia de celulose, a concentração de endoglucanases adsorvidas no substrato é maior que a de celobiohidrolases, sendo a redução do grau de polimerização da celulose principalmente associada a esse grupo de enzimas (LEVINE *et al.*, 2010).

O domínio catalítico das endoglucanases (Figura 13) não apresenta a estrutura de túnel, e sim uma fenda. Essa característica faz com que o sítio ativo das endoglucanases seja mais hidrofílico, quando comparado ao sítio ativo das celobiohidrolases (HENRIKSSON *et al.*, 1996).

**Figura 13.** Domínio catalítico de endoglucanase II de *Thermobifida fusca.*

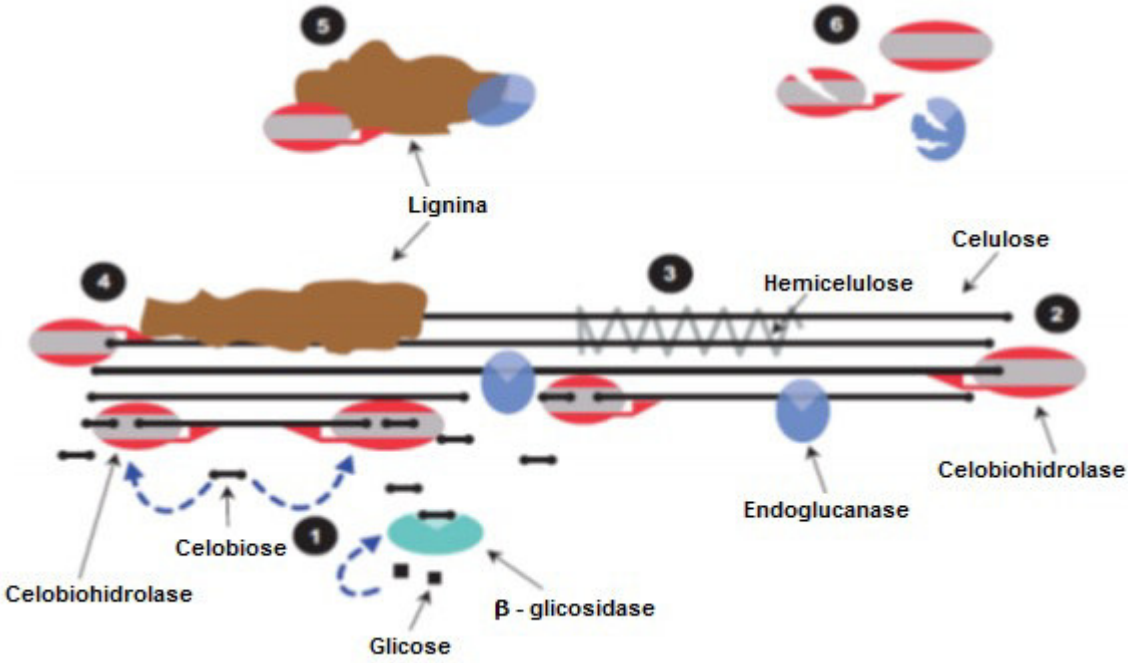


Fonte: (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

O terceiro grupo de enzimas do complexo celulolítico é o das β-glicosidases, ou celobiases, que são responsáveis pela hidrólise de celobiose ou pequenos celuoligossacarídeos, liberando glicose (BHAT; HAZLEWOOD, 2001). A ação das celobiases é de extrema importância para a hidrólise eficaz do material lignocelulósico, já que elas são responsáveis pelo consumo dos oligossacarídeos solúveis, que inibem a ação das celobiohidrolases e das endoglucanases (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

A conversão da celulose em seus monômeros por estas enzimas possui algumas limitações, que podem ser relativas às características estruturais do substrato e ao mecanismo de ação das enzimas hidrolíticas (Figura 14). As características estruturais podem ser químicas, quando relacionadas à composição do material lignocelulósico, ou físicas, se relacionadas ao grau de polimerização, à cristalinidade, à área superficial e volume de poro, ao tamanho de partícula e à distribuição da lignina e da hemicelulose (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999; ZHU *et al.*, 2008).

**Figura 14**. Limitantes da hidrólise enzimática da celulose.




1. Inibição pelo produto; 2. Adsorção improdutiva na celulose; 3. Diminuição da acessibilidade das enzimas pela hemicelulose; 4. Diminuição da acessibilidade das enzimas pela lignina; 5. Adsorção improdutiva na lignina; 6. Inativação das enzimas. Fonte: (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

O principal efeito da lignina como limitante da sacarificação enzimática da celulose está relacionado à diminuição da acessibilidade das enzimas hidrolíticas às fibras celulósicas. Isso tem sido confirmado por muitos trabalhos, nos quais a remoção da lignina aumentou consideravelmente os níveis de hidrólise do material. A remoção da lignina gera poros no material, aumentando a área acessível às enzimas hidrolíticas (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; LEE *et al.*, 2009; VÁRNAI; SIIKA-AHO; VIIKARI, 2010). Outra confirmação desse efeito é que a relocalização da lignina na parede celular, causada por alguns pré-tratamentos, garante também maiores valores de conversão, sem alterar, contudo, a quantidade de lignina no material (DONOHOE *et al.*, 2008).

No entanto, muitos trabalhos mostram que a lignina é capaz de limitar a hidrólise enzimática de outra forma. As enzimas hidrolíticas podem adsorver na lignina, principalmente através de interações hidrofóbicas, reduzido a quantidade de enzimas disponível para atuar na fibra celulósica. Esse fenômeno é conhecido como adsorção improdutiva, e tem sido considerado um fator limitante importante da hidrólise dos materiais lignocelulósicos (BERLIN *et al.*, 2005; PALONEN, *et al.*, 2004). Além disso, durante a hidrólise, componentes de baixa massa molar da lignina são solubilizados na fase

aquosa e esses compostos exercem também influência negativa nos níveis de hidrólise enzimática da celulose (BERLIN *et al.*, 2006).

A composição da lignina também é um importante fator limitante da hidrólise dos polissacarídeos da parede celular. Modificações na composição da lignina (relação Siringil/ Guaiacil, por exemplo) podem alterar os níveis de conversão, mesmo mantendo o mesmo teor (CHEN; DIXON, 2007; GRABBER *et al.*, 2004).

A cristalinidade da celulose pode ser um fator importante para a sua conversão. Como a região cristalina da celulose é mais compacta, o acesso das endoglucanases é dificultado nessas regiões, de forma que a hidrólise ocorre principalmente pela ação das celobiohidrolases. Nas regiões amorfas, o acesso das endoglucanases é menos restrito e a hidrólise é mais eficaz (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999).

### 2.5.1 Índice de Cristalinidade e técnicas de determinação

A cristalinidade é uma propriedade importante na diferenciação e classificação de materiais celulósicos. A literatura reporta inúmeras tecnologias para a determinação da cristalinidade como a ressonância magnética nuclear de $^{13}C$ no estado sólido espectroscopia no infravermelho e espectroscopia Raman e o mais comumente utilizado, difratometria de raios-X (PARK *et al.,* 2010, LENGOWSKI, 2012, LEPPÄNEN *et al.,* 2009). A técnica de difração de raios-X utiliza o espalhamento desta radiação por estruturas organizadas (cristais), permitindo realizar estudos morfológicos em materiais, determinando sua estrutura amorfa e sua fração cristalina (BAUMHARDT NETO, 2007).

Em 1962, Segal e colaboradores sugeriram uma metodologia para a determinação da cristalinidade de um material, denominado índice de cristalinidade (IC), baseada na existência de dois componentes no material celulósico: um cristalino e um não cristalino ou amorfo. Essas frações são determinadas a partir de diferentes picos com distintas intensidades, sendo o índice de cristalinidade simplesmente calculado entre a diferença entre as intensidades divido pela intensidade do pico máximo (FRENCH *et al.,* 2013).

O Método de Seagal, muito empregado na literatura para a determinação do índice de cristalinidade de celulose, possui limitações, como o fato de que as medições realizadas em raios-X não divulgam as características da celulose a um nível molecular, mas somente fornece indícios de quanto o material é cristalino ou não. Ainda assim a medida do índice

de cristalinidade envolve diretamente dados referentes ao tamanho dos cristais existentes na celulose do material. (FRENCH *et al.,* 2013, OLIVEIRA; DRIEMEIER, 2013; AGARWAL *et al.,* 2010; PARK *et al*., 2010)

French e Cintrón (2013) e Driemeier e Bragatto (2013) reportam a complexidade da determinação do chamado índice de cristalinidade de um material devido ao principal fato da dificuldade de definição entre uma estrutura cristalina e não cristalina ou amorfa e a linha tênue para uma separação entre elas. Uma quantificação cabível de ser realizada é referente à largura dos cristais de celulose presente em uma determinada amostra, representando a dimensão lateral do cristal. O tamanho de cristal apresenta uma relação importante com o pico obtido da difração de raios-X, denominada de equação de Scherrer (LANGFORD; WILSON, 1978; SCHERRER, 1918). Para a determinação da largura de cristal utiliza-se o pico 200 do difratograma de raios-X. Este pico é usado por ser mais intenso e as sobreposições serem menos críticas que em relação aos picos $1\underline{1}0$ e 110, geralmente utilizados na determinação do Índice de Cristalinidade pelo Método Seagal (DRIEMEIER; BRAGATTO, 2013).

A determinação da cristalinidade por meio da espectroscopia de infravermelho é um método indireto e simples, fornecendo valores relativos devido à contribuição da largura de cristal das amostras no espectro. Entretanto, a presença de lignina e hemicelulose pode alterar a intensidade dos picos apresentados no espectro, sendo assim considerada uma metodologia para fornecer índices qualitativos de largura desses cristais de celulose.

## 2.6 Fermentação

A fermentação da glicose é um processo bem estabelecido e o microorganismo mais apropriado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O emprego intensivo desse microrganismo em fermentações industriais implicou num processo de seleção natural, permitindo melhores desempenhos na conversão de glicose a etanol, na produtividade e na tolerância alcoólica (ANDRADE *et al.*, 2013).

Os materiais lignocelulósicos, quando hidrolisados produzem hexoses oriundas da celulose que é facilmente fermentada pelos microorganismos. Já a hidrólise da hemicelulose fornece pentoses (xilose e arabinose), que não são diretamente fermentadas

por leveduras industriais convencionais, sendo a bio-transformação dessas pentoses a etanol um desafio no âmbito científico e tecnológico.

Dependendo das condições em que se desenvolvem os pré-tratamentos do material lignocelulósico, se originam compostos que irão atuar como inibidores da fermentação. Os produtos de degradação, que são potenciais inibidores da fermentação, se agrupam em três categorias (DOMINGUEZ, 2003): derivados do furano; ácidos alifáticos de baixa massa molecular e derivados fenólicos.

Dentre os compostos inibidores formados destacam-se o furfural, formado a partir da degradação das pentoses (xilose e arabinose) e o hidroximetilfurfural (HMF), formado da degradação de hexoses (glicose). Além desses dois ácidos, forma-se ácido acético, procedente da hidrólise dos radicais acetil da hemicelulose. Entre os efeitos negativos produzidos pelo furfural e pelo HMF sobre as leveduras da fermentação alcoólica, estão a diminuição da taxa de crescimento, a diminuição da produtividade de etanol e a redução da síntese de biomassa (TAHEZRADEH; KARIMI, 2007).

Durante o pré-tratamento, uma parte da lignina também se degrada originando uma grande variedade de compostos fenólicos. Dentre esses, encontram-se ácidos, aldeídos e álcoois aromáticos.

Uma alternativa para reduzir a concentração dos compostos tóxicos gerados no pré-tratamento é o emprego de adsorção através de carvão ativo ou carvão vegetal na destoxificação dos licores hidrolíticos, visando melhores rendimentos em etanol (MIYAFUJI *et al.*, 2003).

São propostas quatro rotas para realizar a fermentação alcoólica de um substrato contendo pentoses e hexoses. O processo SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation) no qual a sacarificação e fermentação ocorrem separadas, com fermentação dos açúcares C5 e C6 separados; SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) em que ocorre a sacarificação e fermentação de C6 simultânea; SSCF (Simultaneous Saccharification and CoFermentation) em que ocorre a sacarificação e fermentação simultânea com cofermentação dos açúcares C5 e C6 e, o CBP (Consolidated Bioprocess), em que a produção de enzima, sacarificação e fermentação ocorrem de forma simultânea (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009).

A fermentação do caldo de açúcares redutores, obtido após a hidrólise dos materiais lignocelulósicos, é um estágio importante para atingir um processo de obtenção de etanol de segunda geração que assegure uma conversão mínima destes açúcares e seja compatível com um custo de produção factível, sob uma visão técnica e econômica. Ainda deve ser

levado em conta o consumo energético associado às condições de fermentação e a concentração de etanol no vinho final obtido (ROSSELL, 2007).

A técnica do reciclo de células é aplicada em 70-80% das destilarias brasileiras (BRETHAUER; WYMAN, 2010). Entre suas vantagens estão a redução de tempo e custos envolvidos com a suplementação de nutrientes no preparo do inóculo (SANDA *et al*., 2011), diminuição no consumo de carbono para o crescimento celular e um incremento da produtividade de etanol (BRETHAUER; WYMAN, 2010). Além disso, é possível ter maiores concentrações de células no fermentador (10-17% m/v base úmida), quando comparado com os processos comuns. Como consequência, o tempo de fermentação é reduzida para 6-11 h (BASSO *et al.*, 2008) e há um incremento na produção de etanol a 90-92% do valor teórico. Além disso, ocorre uma selecção de leveduras resistentes imposta pelas condições de estresse operacional encontrados no ambiente industrial, tais como altas temperaturas e concentrações de etanol, estresse osmótico, devido às altas concentrações de sal e açúcar, contaminação microbiana e acidificação do meio (MIRANDA JUNIOR *et al.*, 2009). Reciclo de células permite a adaptação e condicionamento de microrganismos nocivos para as condições do processo (SLININGER *et al*., 2011). Assim, essa prática pode ser usada como uma estratégia para obter maior desempenho do processo e um comportamento desejável do microorganismo (ANDRADE *et al.*, 2013).

## 2.7 Ampliação de Escala

No desenvolvimento de processos quando são encontradas condições econômicas adequadas de operação em escala de bancada, as quais com frequência correspondem à obtenção de valores elevados para a produtividade e rendimento do produto de interesse, sob o ponto de vista econômico, há a necessidade de se ampliar a escala de produção até uma escala industrial. A variação de escala, partindo de uma escala de produção menor para uma escala maior é conhecida como aumento de escala ou "scale-up" (BADINO Jr; SCHMIDELL, 2001).

Dessa forma, o estudo da variação de escala de processos examina os problemas associados com a transposição de dados obtidos em equipamentos de escala de laboratório para uma maior. O grande problema da variação de escala está exatamente em reproduzir, na escala industrial, condições ambientais responsáveis pelo bom desempenho do sistema,

obtidas na bancada. Particularmente, alguns fatores físicos dependem da escala e, por esta razão, devem ser tratados com maior cuidado (BADINO Jr; SCHMIDELL, 2001).

Não muitos trabalhos sobre a ampliação de escala dos pré-tratamentos para biomassa são apresentados na literatura.

Mosier *et al.* (2005) apresentaram a ampliação de escala do pré-tratamento hidrotérmico (LHW) de fibra de milho para produção de etanol, mostrando que o tratamento em escala piloto reproduzia os resultados obtidos em laboratório ilustrando a utilidade e viabilidade da abordagem do estudo, afirmando que, testes preliminares bem sucedidos abrem portas para a análise da robustez do sistema de pré-tratamento em condições de operação mais amplas.

Um estudo da ampliação de escala, de miligramas para um quilograma de biomassa, do pré-tratamento alcalino com peroxido de hidrogênio integrado a hidrolise enzimática e fermentação alcoólica (AHP) de palha de milho foi apresentado por Banerjee *et al.* (2012). Nesse estudo concluiram que o tratamento AHP é facilmente escalável, além de ser vantajoso em relação aos custos de investimento, à simplicidade de processo e manuseio de matéria-prima, e à compatibilidade com a sacarificação e fermentação simultânea.

Lee *et al*. (2011) apresentam um estudo de ampliação de escala de pré-tratamento com ácido oxálico de biomassa lignocelulósica agrícola para a produção de bioetanol, ampliando o pré-tratamento de sabugo de milho para escala piloto, para obtenção de hidrolisado hemicelulósico. Com o pré-tratamento consegue diminuir de 27,86% para 6,76% o teor de hemicelulose no material sólido, conseguindo após fermentação usando *Scheffersomyces stipitis* um rendimento em etanol de 86% do teórico.

Um estudo mais embasado foi apresentado por Rodrigues *et al.* (2010). Em tal estudo reportam a ampliação de escala da hidrólise com ácido sulfúrico diluído para produção de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Um modelo matemático específico com base no Fator-H (fator que combina a temperatura e o tempo de residência na reação empregando a equação de Arrhenius para modelar a concentração de ácido sulfúrico e energia de ativação), permitiu estimar os resultados através da simulação das condições (temperatura e tempo de reação) prevalecentes nos reatores com diferentes desenhos. O hidrolisado hemicelulósico obtido em diferentes reatores, mas sob o mesmo fator H de 5,45 ± 0,15 alcançaram rendimento de xilose semelhante (aproximadamente 74%) e baixa concentração de produtos de degradação do açúcar, como o furfural (0,082 g/ L) e HMF (0,0071 g/ L).

Estudos da ampliação de escala para os processos de fermentação, mesmo quando simultâneo à sacarificação, são estudados com uma abordagem mais preocupada com os parâmetros físicos como taxas de transferência de calor, de oxigênio e regime de escoamento.

Ogboma, Mashima e Tanaka (2001) reportam a ampliação de escala para a produção de etanol combustível a partir do suco de beterraba, usando bioreator com célula imobilizada em esponja vegetal, mostrando a dificuldade na ampliação, sendo necessárias adaptações na forma de imobilização das células e no reator para tornar possível a ampliação e obter resultados similares nas diferentes escalas.

Shao *et al*. (2010) relatam como um gargalo a ausência de uma abordagem sistemática da ampliação de escala para a bioconversão do material lignocelulosico e apresentam um procedimento para a ampliação de escala, baseados em dados de fluido-dinâmica computacional, tendo elegido a suspensão de partículas sólidas como critério de ampliação de escala. Imamoglu *et al*. (2013) avaliaram a ampliação de escala da produção de etanol a partir do licor de hidrólise ácida da casca de arroz, com uma *E. colli* recombinante KO11, usando o número de Reynolds e a velocidade do impelidor como constantes para a ampliação. Em 2015, Deniz, Imamoglu e Sukan avaliaram os parâmetros de ampliação de escala da produção de etanol a partir de bagaço de marmelo, concluindo que para a ampliação de escala de fermentação de meios viscosos, o tempo de mistura é o parâmetro mais importante devido à necessidade de homogeneidade no meio.

Uma das principais conclusões do relatório sobre a implantação de sistemas de bioenergia no mundo, denominado Processo Rápido de Avaliação sobre Biocombustíveis e Sustentabilidade, elaborado por pesquisadores vinculados aos programas especiais da FAPESP de Pesquisa em Bioenergia (Bioen), de Pesquisas em Caracterização, Conservação, Restauração e Uso Sustentável da Biodiversidade (Biota) e de Pesquisa sobre Mudanças Climáticas Globais é que, o atual estágio de desenvolvimento científico e tecnológico já permite que a produção de bioenergia possa ser feita em larga escala no mundo. Mas, para que isso aconteça de fato, é necessária a adoção de políticas públicas que se preocupem com toda a cadeia de produção de energias renováveis, incluindo desde a questão do uso da terra e a eficiência das tecnologias de conversão de biomassa em energia até os desafios ambientais, econômicos e sociais envolvidos.

A iniciativa conjunta do BNDES e Finep – Inovação e Pesquisa por meio do PAISS, em 2011, viabilizou a implementação das três primeiras plantas de etanol de segunda geração (E2G) no Brasil, das quais duas em escala comercial e outra demonstrativa, o que

significou um passo importante na trajetória evolutiva do E2G, até então limitado a iniciativas em escalas laboratorial e piloto. Contudo, a capacidade dessas plantas, em conjunto, chega a pouco mais de 140 milhões de litros por safra (MILANEZ *et al.*, 2015), volume ainda pequeno quando comparado aos níveis de importação de gasolina, que a produção interna de E2G poderia reduzir. O ápice da importação ocorreu em 2012, quando o país importou 3,8 bilhões de litros. Em 2014, foram importados 2,2 bilhões de litros de gasolina (MILANEZ *et al.*, 2015).

# 3 Objetivo

Contribuir para o desenvolvimento do processo de produção do etanol de segunda geração através do estudo da ampliação de escala do pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar, avaliando a influência desse escalonamento na solubilização dos principais componentes do material, no rendimento final de conversão enzimática e fermentação.

***Objetivos específicos:***

- Avaliar o efeito da ampliação de escala na característica das polpas obtidas, comparando às polpas obtidas em escala laboratorial;
- Avaliar a influência do uso da antraquinona no processo de pré-tratamento e na etapa subsequente de hidrólise;
- Avaliar o balanço de massas do processo quanto ao fluxo dos principais componentes lignocelulósicos;
- Eleger a condição de pré-tratamento com maior rendimento em carboidratos após hidrólise;
- Avaliar a fermentação alcoólica deste hidrolisado, utilizando diferentes leveduras e diferentes estratégias de fermentação visando maior produtividade em etanol.
- Avaliar a viabilidade técnica do processo.

# 4 Materiais e Métodos

## 4.1 Bagaço de cana

O bagaço utilizado neste trabalho é proveniente da Usina da Pedra, localizada na cidade de Serrana, no estado de São Paulo. A variedade de cana predominante na safra em que foi recolhido (2011/2012) é a SP81-3250. O bagaço foi seco a temperatura ambiente até atingir um teor de umidade de aproximadamente 10% e estocado para sua posterior utilização.

## 4.2 Escala laboratorial - Planejamento fatorial $2^3$ do pré-tratamento com hidróxido de sódio e antraquinona.

O planejamento fatorial $2^3$ com 3 experimentos no ponto central para o pré-tratamento do bagaço de cana com hidróxido de sódio e antraquinona foi realizado junto com a equipe do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE, variando três parâmetros do processo: tempo de reação ( 30- 60- 90 min), temperatura (130- 150- 170°C) e concentração de NaOH (0,5- 1,0- 1,5 %, m/v). As reações foram conduzidas em reator Parr de aço inoxidável de 2 L de capacidade, munido com controle de temperatura e pressão, sendo a proporção de antraquinona mantida fixa em 0,15% (m/m) para cada ensaio, valor já otimizado pelas industrias de celulose e papel (FENGEL; WEGENER, 1989). Após as reações, o reator foi resfriado, despressurizado e aberto. As polpas foram filtradas, lavadas com água, pesadas e reservadas para posteriores análises.

Como variáveis de resposta foram avaliadas a solubilização dos principais componentes (celulose, lignina e hemicelulose) e, a conversão enzimática da polpa obtida.

## 4.3 Ampliação de escala - Pré-tratamento alcalino em escala piloto

Os pré-tratamentos alcalinos foram realizados, utilizando 12 kg de bagaço seco, relação sólido:líquido 1:15, nas condições otimizadas pelo planejamento experimental

(NaOH 1,5% (m/v); 30 minutos e temperaturas de 130°C e 170°C), com e sem a utilização de antraquinona, em duplicatas. O reator utilizado foi um reator POPE Scientific fabricado em aço Hastelloy 276, com capacidade de 350L, munido de agitação mecânica, aquecimento por vapor fluente e/ou óleo térmico e supervisório automatizado para monitoramento de temperatura, pressão e frequência de agitação durante o processo.

O reator foi primeiramente carregado com 160L de água e aquecido até 80°C. Só então foi adicionado o bagaço (12 kg-base seca) e o hidróxido de sódio em quantidade de água suficiente para uma relação final sólido-líquido de 1:15 (m/v), iniciando após esse estágio o aquecimento através de fluído térmico até atingir a temperatura de trabalho das reações. O reator foi mantido na temperatura de trabalho durante 30 min, sendo após isso gradativamente despressurizado até zero bar.

O material foi então filtrado em filtro tipo Nutsche da POPE Scientific, com capacidade de 100L, munido de agitação mecânica para ressuspensão da biomassa pré-tratada. A fração líquida, denominada licor negro, foi recolhida para posterior precipitação da lignina. A fração sólida, denominada polpa celulósica, foi lavada com 50L de uma solução de NaOH 1% a frio e submetida a 6 lavagens sucessivas com 50L de água a 80°C.

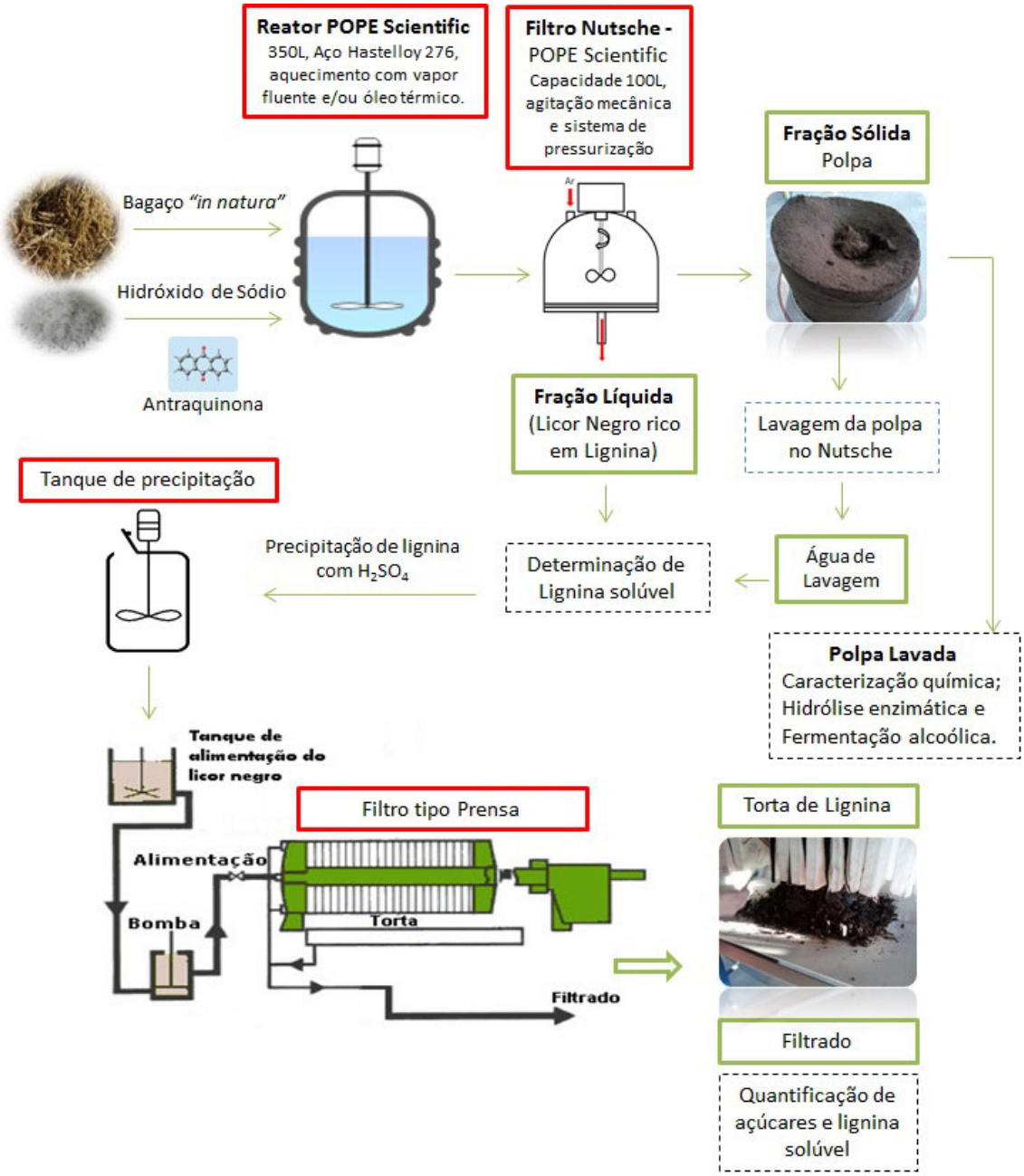
A fração sólida foi guardada em câmara fria para análises quanto à composição química, caracterização por FTIR e posterior testes de hidrólise enzimática e fermentação.

Ao licor negro juntamente com três primeiras lavagens foi adicionado acido sulfúrico até pH=2 (MUSSATO; FERNANDES; ROBERTO, 2007) para precipitação da lignina. A lignina precipitada foi filtrada em filtro prensa, lavada com água no próprio filtro pH próximo ao neutro. No próprio filtro, utilizou-se ar comprimido para se obter uma torta de lignina, que foi recolhida em bandejas e seca em estufa a 50°C. A lignina seca obtida foi caracterizada por FTIR e o sobrenadante, recolhido na saída do filtro prensa, foi analisado quanto ao teor de açúcares em HPLC para completar o balanço de massas.

O mesmo procedimento foi seguido para as reações com e sem adição de antraquinona, sendo a proporção de antraquinona mantida fixa em 0,15% (m/m) para cada ensaio, valor este utilizado nos ensaios em escala laboratorial.

A Figura 15 a seguir mostra um fluxograma esquemático das etapas realizadas em escala piloto.

**Figura 15.** Fluxograma esquemático do pré-tratamento em escala piloto.




Fonte: Próprio autor.

## 4.4 Caracterização química do material lignocelulósico

A composição química do bagaço "in natura" e do material pré-tratado em cada uma das condições estudadas, foi analisada de acordo com a metodologia analítica desenvolvida por Rocha *et al.* (1997) e validada por Gouveia *et al.* (2009). Essa metodologia é baseada

em uma hidrólise ácida em duas fases a partir de material livre de extrativos, seguindo os passos descritos a seguir:

**1. Hidrólise com ácido sulfúrico 72%**

Amostras de 2 g do material lignocelulósico moído a 0,8mm, pesadas com precisão de 0,1 mg foram transferidas para béqueres de 100 mL e tratadas com 10 mL de $H_2SO_4$ 72% v/v, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado a 45 °C por 7 min. A reação foi parada pela adição de 50 ml de água destilada, e a mistura resultante foi transferida quantitativamente para frascos erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se o volume de 275 mL de água destilada. Os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 1 atm para hidrólise total dos açúcares.

Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo. A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume completado com a água de lavagem do material retido no filtro. A solução foi armazenada para análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, HMF e lignina solúvel.

**2. Determinação de lignina insolúvel em meio ácido**

O material retido no papel de filtro foi lavado com 1500 mL de água destilada, para remoção de ácido residual (até pH próximo de 7), transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 100 °C até massa constante. A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco descontando-se a massa de cinzas presente na lignina.

**3. Determinação de lignina solúvel**

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro UV-visível Thermo Scientific modelo Evolution 300. Uma alíquota de 5 mL do hidrolisado obtido da etapa de hidrolise ácida para caracterização química do bagaço de cana foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 50 mL de água destilada e 2 mL de NaOH 6,5 N (pH final próximo a 12).

Após agitação, o volume foi completado com água destilada e essa mistura resultante foi analisada no espectrofotômetro. As equações abaixo foram utilizadas para determinar a concentração de lignina solúvel no hidrolisado:

$$Clig = 4.187 * 10^{-2} (Alig_{280} - Apd_{280}) - 3.279 * 10^{-4}$$

Em que: $C_{lig}$ - concentração de lignina solúvel, em g/L;

$A_{lig280}$ - absorbância da solução em 280 nm;

$A_{pd280}$ - absorbância de furfural e HMF

$$Apd_{280} = C1 * \varepsilon 1 + C2 * \varepsilon 2$$

Sendo: C1- Concentração de furfural (g/L), previamente determinada por HPLC;

C2- Concentração de HMF (g/L), previamente determinada por HPLC;

$\varepsilon_1$: absortividade furfural (146,85 L/g.cm)

$\varepsilon_2$: absortividade HMF (114,00 L/g.cm)

Obs: Essa equação, de Gouveia *et al*, 2009, foi determinada com a absortividade de ligninas obtidas por processo de explosão a vapor, mas vem sendo utilizada para a análise de diversas ligninas provenientes de bagaço de cana.

### 4. Determinação de carboidratos e ácidos orgânicos

Os teores de celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético presentes na fração líquida foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Uma pequena amostra do hidrolisado foi filtrada em filtro de PVDF Millex 22µm e analisada em um cromatógrafo Agilent Infinity 1260 empregando um detector de índice de refração Shodex RI-101 e uma coluna de troca iônica Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm, BIORAD). A fase móvel utilizada é $H_2SO_4$ 0,005 mol/L com fluxo de 0,6 mL/min a 35ºC. As concentrações dos compostos foram determinadas a partir de curvas de calibração traçadas para cada componente.

### 5. Determinação de furfural e hidroximetilfurfural (HMF)

Os produtos de decomposição dos açúcares (furfural e hidroximetilfurfural) presentes na fração líquida foram analisados por HPLC, em uma coluna C18 (3 µm) de 150 x 4,6 mm, utilizando-se acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético como fase móvel, a uma vazão de 0,8 mL/min, à temperatura de 25 °C.

O material foi previamente diluído com água na razão de 1:5, sendo filtrado em membrana de diâmetro de poro de 0,47 μm (Milipore), para total remoção de partículas sólidas das amostras ,e injetado com uma válvula Rheodyne equipada com alça de injeção de 10 μL. Os compostos foram detectados em 274 nm por um detector UV-visível. As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas a partir das curvas de calibração obtidas com os compostos puros.

**6. Determinação do teor de cinzas da lignina**

Os materiais resultantes da etapa de determinação de lignina insolúvel foram colocados em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Posteriormente, estes materiais foram inicialmente pré-calcinados à temperatura de 400 °C, por aproximadamente 1 h, com os cadinhos tampados, e em seguida, removeu-se a tampa e calcinou-se o material por 2 h a 800 °C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada. A massa obtida foi utilizada para subtrair do teor de lignina descrito no item **2** desta seção para então se obter a massa real de lignina insolúvel.

**7. Determinação do teor de cinzas totais**

Para determinação do teor de cinzas totais, foram pesados aproximadamente 2 g de material lignocelulósico (base seca) em cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Posteriormente estes materiais foram inicialmente pré-calcinados à temperatura de 400 °C, por aproximadamente 1 h, com os cadinhos tampados, e em seguida, removeu-se a tampa e calcinou-se o material por 2 h a 800 °C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada.

**8. Determinação de extrativos**

Para a determinação do teor de extrativos, realizado somente para o material "*in natura*", efetua-se uma extração em aparelho soxhlet, com uma mistura ciclohexano/etanol, seguido de extração com água. Os teores determinados são referentes à porcentagem mássica.

## 4.5 Infravermelho com transformada de Fourier

As análises de FTIR foram obtidas na região de 4000-650 $cm^{-1}$ em um espectrofotômetro Spectrum 400 series FT-IR/FT-NIR spectrometers da marca PerkinElmer, utilizando uma amostra em pó. Utilizou-se o modo com Refletância Total Atenuada (Attenuated total reflectance ATR) com cristal de selênio de zinco, varredura de 32 ciclos e resolução: 4 $cm^{-1}$ (NASCIMENTO et al., 2016). A técnica ATR permite que as amostras sólidas ou líquidas sejam analisadas diretamente, sem a necessidade de uma prévia preparação.

## 4.6 Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias das polpas foram obtidas em um equipamento FEI® (modelo Quanta 650FEG) com detector Everhart Thornley SED (secondary electron detector) a uma potência do feixe de elétrons de 5,0 kV (disponível no Laboratório Nacional de Nanotecnologia - LNNano). Para obtenção das imagens, as amostras foram previamente submetidas ao recobrimento metálico de 16 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC SCD 050 e mantidas em dessecador até o momento da análise (ROCHA et al., 2015 b).

## 4.7 Difratometria de Raios-X

Com o propósito de se avaliar a mudança de cristalinidade da celulose presente no bagaço de cana após o pré-tratamento, amostras do material em estudo, secas e moídas, foram acondicionadas em tubos capilares e analisadas na geometria da fibra usando um gerador de ânodo rotativo Rigaku ultraX-18HF com radiação Cu Kα ($\lambda$ = 1,5418 Å), monocromador óptico VariMAX HR e placa de imagem mar345 (posicionada 120 milímetros atrás da amostras). Os padrões de difração bidimensionais foram analisados pelo modelo Cellulose Rietveld Analysis for Fine Structure (CRAFS), conforme literatura (OLIVEIRA; DRIEMEIER, 2013; DRIEMEIER ; BRAGATTO, 2013; DRIEMEIER; CALLIGARIS, 2011; DRIEMEIER *et al.*, 2011).

## 4.8 Sorção de Vapor Dinâmica

O teste de sorção de vapor é uma técnica de análise gravimétrica que testa, em uma dimensão complementar, a interação entre a água e a celulose, relacionando parâmetros determinados nas análises ao volume de poros na celulose. O teste foi realizado segundo Driemeier, Mendes e Oliveira (2012) em um instrumento TA Q5000 SA, que mede a massa da amostra enquanto controla a umidade relativa ($h$). O controle foi feito por meio da modulação entre os fluxos de $N_2$ seco ($h$ = 0) e vapor de água saturado ($h$ = 1). A calibração do instrumento foi feita seguindo as recomendações do fabricante. A análise foi feita a 50°C com o objetivo de acelerar os processos de sorção e dessorção. A umidade relativa do ar foi estabelecida primeiramente igual a 0,95, em seguida, 0,90, e, em seguida, diminuida de 0,10 a cada etapa até zero. Em seguida, a umidade relativa foi aumentada na ordem inversa. A umidade relativa foi mantida por 60 min em cada passo, exceto no $h$ = 0, em que foi mantida durante 180 min para melhorar a definição da amostra de massa seca (~ 5 mg).

## 4.9 Poder calorífico superior

O poder calorífico foi determinado empregando-se uma bomba calorimétrica IKA C-200 da Labcontrol segundo a norma ABNT NBR 8633/84 e manual da bomba calorimétrica. Neste aparelho a combustão ocorre a volume constante (W = 0), de modo que a quantidade de calor, Q, recebida pelo conjunto que forma o calorímetro é igual em módulo à variação de energia interna do sistema reacional. Realizou-se a queima de um (1,0) grama do material, previamente pastilhado. Como a quantidade de calor gerada é medida incluindo o calor da condensação da água formada na queima, o poder calorífico medido é o Poder Calorífico Superior (PCS).

## 4.10 Análise elementar

A análise elementar das ligninas foi realizada utilizando um aparelho da PerkinElmer, modelo 2400 Series II CHNS/O. A técnica é baseada na combustão de uma amostra do material a ser analisado para a determinação das quantidades de carbono,

enxofre, hidrogênio e nitrogênio. A quantidade de oxigênio foi obtida pela diferença entra a massa inicial de amostra e o somatório da quantidade dos outros elementos previamente determinados (MARABEZI, 2009).

## 4.11 Balanço de Massa do Processo de Pré-tratamento

Para a determinação do balanço de massas dos processos de pré-tratamento alcalinos estudados, com e sem adição de antraquinona, considerando a celulose, a hemicelulose (xilose, arabinose e grupos acetil) e a lignina, foram feitos os seguintes cálculos e considerações.

O rendimento da reação foi calculado como uma percentagem do total de sólidos recuperados após pré-tratamento com base na amostra inicial (peso seco). Polímeros, oligômeros, monômeros e produtos de degradação como HMF, furfural e ácido fórmico foram medidos e considerados, de acordo com as vias de degradação, com o intuito de chegar perto de 100% do balanço de massas.

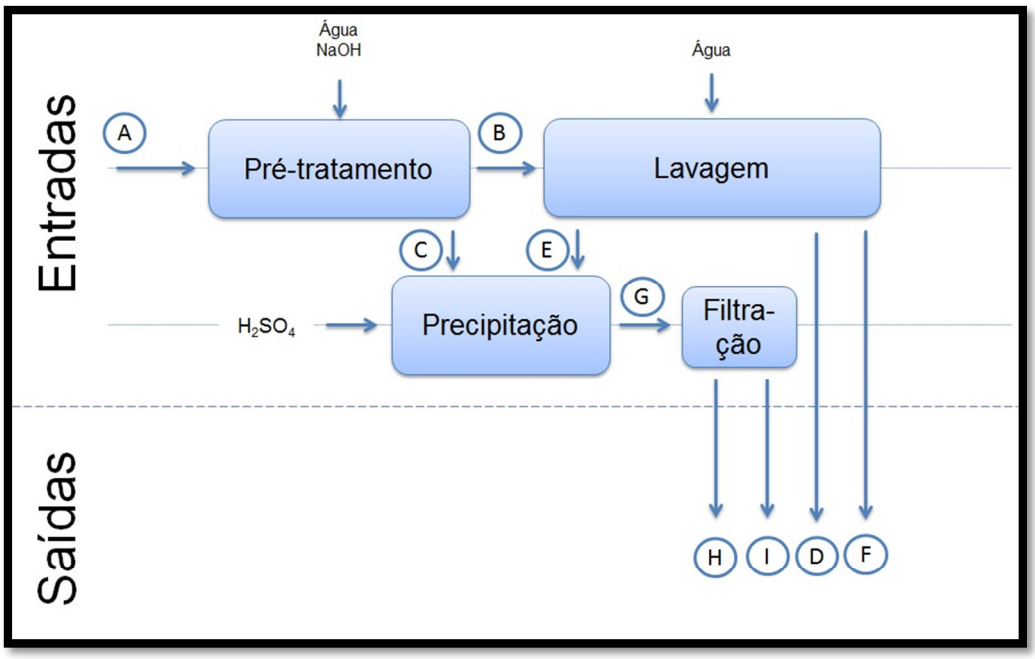
Para tal, todos os componentes de todos os fluxos foram compilados e reportados para cada etapa do processo de pré-tratamento. Os dados reais gerados para cada pré-tratamento são referidos como a média de duas repetições.

As concentrações de glicose, celobiose, ácido fórmico e HMF foram usadas para o cálculo do teor de celulose, enquanto que o teor de hemicelulose foi calculado com base nas concentrações de xilose, arabinose, ácido acético e furfural. As suas massas foram divididas pelo peso seco do material inicial e multiplicadas pelos fatores de hidrólise, que foram 0,9, 0,95 e 1,29, 3,52, respectivamente, para a glicose, celobiose, HMF e ácido fórmico, e 0,88 para ambos, xilose e arabinose, 0,72 para o ácido acético e 1,37 para furfural. Assumiu-se, para os cálculos, que todo furfural é proveniente de xilose.

Para a quantificação da lignina contida em todas as correntes líquidas, as alíquotas foram diluídas com água destilada e o pH ajustado para cerca de 12 utilizando NaOH 6,5 mol/L. As medições foram feitas pela medida de absorbância em espectrofotômetro a 280 nm.

O balanço de massa foi feito considerando as correntes de entrada e saída do reator, e dos procedimentos posteriores de lavagem da polpa e precipitação da lignina contida no licor negro, conforme fluxograma esquemático abaixo (Figura 16).

**Figura 16.** Fluxograma esquemático com as correntes de entrada e saída do processo.




A) Bagaço *in natura*; B) Polpa não lavada; C) Licor negro; D) Polpa Lavada; E) 1ª e 2ª água de lavagem; F) Água de lavagem; G) Mistura para precipitação da lignina; H) Lignina precipitada e I) Filtrado. Fonte: Próprio autor.

## 4.12 Hidrólise enzimática da polpa

- Metodologia para hidrólise em *shaker*

A hidrólise enzimática foi realizada empregando a celulase comercial Celluclast 1.5L, suplementada pela β-glicosidase (Novozym 188). As condições para a reação de hidrólise foram: tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8, relação sólido:líquido 1:10, agitação orbital a 150 rpm, 50ºC por 72 h. As cargas enzimáticas foram 10 FPU/g de material seco de Celluclast 1.5 L e 20 UI/g de material seco de β-glicosidase,. Após o término, os hidrolisados foram fervidos por 5 min, filtrados em cadinhos de vidro sinterizado n.º 3 e o filtrado analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Os resíduos da hidrólise foram separados e secos em estufa a 105°C para posterior quantificação de massa residual. A conversão enzimática de celulose foi calculada pela equação a seguir:

$$CC = \frac{m_{glicose} \text{ x } f_h}{m_{inicial} \ x \ y_i} \ x \ 100$$

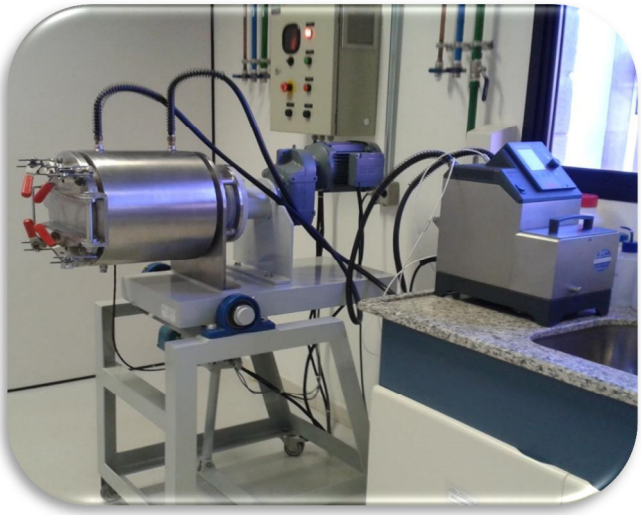
Sendo:

CC - Conversão enzimática da celulose; $m_{glicose}$ - massa de glicose presente no hidrolisado (g); $m_{inicial}$ - massa seca de material lignocelulósico (g); $y_i$ - teor centesimal de celulose no material lignocelulósico; $f_h$ - fator de hidrólise da celulose (correspondente a 0,9).

- Metodologia para hidrólise em reator horizontal de 15L

A hidrólise enzimática foi realizada em reator horizontal modelo MRP de 15 litros, fabricado em aço inox AISI 316I nas partes em contato com o produto e o restante em aço inox AISI 304. O reator é equipado com jaqueta para circulação de água quente, como mostra a Figura 17. Foram utilizadas as mesmas condições de hidrólise e cargas de enzima empregadas no ensaio em shaker: tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8, relação sólido:líquido 1:10, agitação constante a 50ºC por 72 h. A massa de material utilizada nos ensaios em reator foi 700g (base seca). Após o término, o hidrolisado foi resfriado em banho de gelo e centrifugado a 10°C por 30 min a 8000rpm. O sobrenadante foi analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e o resíduo da hidrólise foi seco em estufa a 105°C para posterior quantificação de massa residual.

**Figura 17.** Reator de Hidrólise



Fonte: Próprio autor.

### 4.12.1 Atividade enzimática

A atividade celulolítica total (FPase) foi determinada empregando-se a metodologia padrão de Mandels; Andreotti e Roche (1976). Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,3 mL de extrato enzimático, 1,2 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8 e 50 mg de papel de filtro Whatmann n°1 como substrato. O meio foi incubado em um banho-maria à temperatura de 45 °C por 1 h, sendo que, a glicose liberada foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) descrito por Miller (1956). A reação foi interrompida pela adição de 3 mL de DNS, sendo o meio fervido, em seguida, por 5 min. Após o resfriamento, a absorbância em 540 nm foi lida em um espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer modelo Lambda 25.

A atividade da enzima β-glicosidase foi determinada utilizando-se a metodologia descrita por Mongkolthanaruk e Dharmsthiti (2002). Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,1 mL de extrato enzimático e 0.4 mL de solução 0,1% (m/v) de p-NPG (paranitrofenol β-1,4 glicosídeo).

O meio foi incubado em banho-maria a 45 °C por 30 min e após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução 10% (m/v) de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$). A quantidade de glicose liberada foi mensurada pela equivalência molar do p-NP (para-Nitrofenol) na clivagem do p-NPG (1 p-NPG → 1 glicose + 1 p-NP) e utilizando a absortividade molar do p-NP (ε410nm = 15.000 L/mol.cm).

A absorbância em 410 nm foi lida no espectrofotômetro UV-visível PerkinElmer modelo Lambda 25.

## 4.13 Fermentação do Hidrolisado

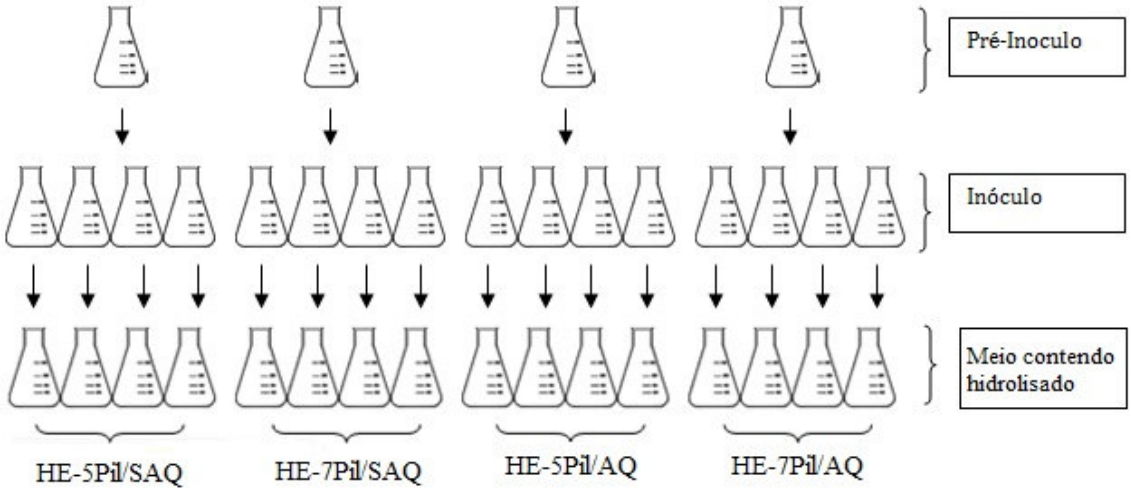
### 4.13.1 Fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1

- Microrganismo e meio de cultura: A linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* - CAT 1 utilizada foi mantida em estoque em meio agar YPD (extrato de levedura/ peptona/ D- glicose). Com o intuito de reativação celular do meio de conservação, uma alçada da cepa estoque *S. cerevisiae* foi transferida para meio líquido YPD contendo (em g/L):

extrato de levedura (10,0); peptona (20,0); e D- glicose (20,0) e mantida em incubador rotatório durante 24 h a 33°C e 200 rpm. Após esse tempo, transferiu-se 0,01 L da suspensão de leveduras para o meio do inóculo. Preparou-se o inóculo em frascos erlenmeyer de 0,25 L contendo 0,1 L de meio na seguinte composição (em g/L): glicose (30,0); extrato de levedura (5,0); ureia (5,0); $KH_2PO_4$ (1,0); KCl (1,0); $CaCl_2$ (1,0), oligoelementos (1,0 mL/L) e tiamina (0,003) e inóculo (SILVA et al, 2015). Os frascos de inóculo foram mantidos em incubador rotatório por 24h a 33°C e 200 rpm. Após 24 horas, o volume de inóculo foi centrifugado a 8000 rpm, 10°C por 20 min; lavado com água estéril, centrifugado novamente e ressuspenso em água estéril para a inoculação dos erlenmeyer (SILVA et al, 2015).

- Fermentação: O teste de fermentabilidade foi realizado em incubador rotatório utilizando frascos erlenmeyer de 0,125 L, contendo 0,05 L de meio de cultura, a 33 °C, 200 rpm e pH entre 4,5 - 5,0. Como fonte de carbono foram utilizados os hidrolisados provenientes da hidrolise enzimática das polpas obtidas nos quatro tipos de pré-tratamento estudados. A saber: HE-5Pil/SAQ; HE-7Pil/SAQ; HE-5Pil/AQ e HE-7Pil/AQ. O meio utilizado para a fermentação foi composto por (em g/L): extrato de levedura (3,2); $KH_2PO_4$ (1,0); hidrolisado e inóculo (SILVA et al, 2015). O volume do inóculo representa 10% do volume final de fermentação (0,005 L) e foi transferido do inóculo para o inicio da fermentação aos erlenmeyers, conforme esquema ilustrado na Figura 18.

**Figura 18**. Representação esquemática da inoculação dos frascos de fermentação.




Foram preparados 5 frascos idênticos, para cada um dos hidrolisados, para a amostragem realizada nos tempos 0h, 2h, 8h, 12h e 24h de fermentação.

Foram coletados para cada ponto, em triplicatas, 2 mL de amostra que foram centrifugadas a 10°C por 3,5 min e 12000 rpm. O sobrenadante foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência, quanto à composição de glicose, xilose, furfural, hidróximetilfurfural, ácido acético, glicerol e etanol. A massa restante foi seca em estufa a 80°C para determinação de massa seca de células.

### 4.13.2 Fermentação em *shaker* com *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124

- Microrganismo e meio de cultura: A linhagem de *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 utilizada foi mantida em estoque em meio liquido YPX (extrato de levedura/ peptona/ xilose) e glicerol (50%) a - 80°C.

Com o intuito de reativação celular do meio de conservação, 2 mL da cepa estoque *S. stipitis* foi transferida para um erlenmeyer de 0,25 L contendo 0,1 L de meio YPX (em g/L): extrato de levedura (10,0); peptona (20,0) e xilose, (20,0) e cultivadas em shaker por 24 horas a 30°C e 200rpm. As células a partir desse pré-inóculo foram recuperadas por centrifugação, ressuspendidas em 0,025 L de água esterilizada e transferidas para um Erlenmeyer de 1 L contendo 0,25 L de meio constituído por (em g/L): extrato de levedura (3,0); ureia (2,3); $MgSO_4$ (1,0); xilose (12); glicose (1,32) e o inóculo (SANTOS et al, 2015; SILVA et al, 2012). O inóculo foi cultivado em incubador rotatório a 30° C e 200 rpm por 24h. As células foram colhidas por centrifugação a 8000 rpm, 10°C por 20 min e suspensas em água de torneira esterilizada no volume adequado para a próxima etapa.

-Fermentação: A fermentação foi realizada em frascos erlenmeyer de 0,5 L, contendo 0,2 L de meio de cultura, a 30 °C, pH 5,00 e incubadas em incubador rotatório. Os meios utilizados para a fermentação de *S. stipitis* são apresentado na Tabela 2 (SANTOS et al, 2015; SILVA et al, 2012). A agitação foi mantida em 200 rpm e a concentração inicial de leveduras foi de aproximadamente 5 g/L. Como fonte de carbono foram utilizados o hidrolisado provenientes da hidrólise enzimática da polpa do Ens. 5Pil/AQ [HE-5Pil/AQ] concentrado e uma amostra denominada controle [C], com açúcares glicose e xilose comercial.

**Tabela 2**. Volumes (mL) das soluções para a composição do meio de fermentação utilizado para fermentação por *S. stipitis*.

| | **Fermentações** | | |
|---|---|---|---|
| | Controle | Hidrolisado* | Concentração final no meio de fermentação |
| **$MgSO_4$ (30 g/L)** | 6,7 mL | 6,7 mL | 1 |
| **Ureia (100 g/L)** | 4,6 mL | 4,6 mL | 2,3 |
| **Extrato de levedura** | 0,6 g | 0,6 g | 3 |
| **Licor** | - | 71 mL | - |
| **Xilose (500g/L)** | 5,82 mL | - | 14,55 |
| **Glicose (500g/L)** | 15,18 mL | - | 37,97 |
| **Água** | 148 mL | 98 mL | - |
| **Inóculo** | 20 mL | 20 mL | 5 |

*Hidrolisado concentrado contendo 106 g/L de glicose e 40,8 g/L de xilose.
**Nota:** Amostragem realizada nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 22 e 24h de fermentação. Foi utilizado um antibacteriano (KAMORAN®) na concentração final de 3 mg/L.

### 4.13.3 Fermentação em Batelada alimentada com reciclo de células, utilizando *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124

- Microrganismo e meio de cultura: Foi utilizada a mesma linhagem de *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. A reativação das células e o crescimento do inóculo foram realizados conforme descrito anteriormente e as células obtidas foram ressuspendidas em volume adequado de água estéril para seguir a etapa de propagação.

A propagação foi realizada para obtenção de volume e massa celular suficiente para a fermentação em biorreator.

- Propagação

A propagação foi realizada em biorreator (Bioflo® 115, 7L, New Brunswick). O meio de crescimento continha (g/L): xarope de cana de açúcar (ART: 30,0), $KH_2PO_4$ (2,0) ureia (5,0), e o inóculo (SANTOS *et al*, 2015). Após o consumo total dos açúcares redutores (ART) (aproximadamente 11 h) foi adicionado um pulso (g/L) de $KH_2PO_4$ (2,0) e ureia (5,0) e foi estabelecida uma alimentação contínua de xarope de cana de açúcar com vazão de 3 gART/ L.h a fim de manter o crescimento linear (SANTOS et al., 2015). A

porcentagem de oxigênio dissolvido foi mantida entre 40 e 50% da saturação para evitar a limitação de oxigênio.

Após o tempo de processo (28 h), cessou-se a alimentação e o meio foi centrifugado de maneira estéril a 8000 rpm por 20 min. Após a centrifugação, as células foram ressuspendidas em um volume mínimo de água esterilizada. O creme de levedura obtido foi armazenado a 4°C e serviu para as etapas posteriores.

- Fermentação em batelada alimentada com reciclo de células

Os ensaios foram realizados em biorreatores (Bioflo® 115, 1.4L, New Brunswick) com volume de trabalho final de 0,7 L a pH 5 utilizando reciclos de células consecutivos. O creme de leveduras obtido na etapa da propagação ocupou 1/3 do volume de trabalho (0,23 L). A alimentação foi realizada nas primeiras 15 h, sendo realizada nas horas seguintes (até 48 h) fermentação em batelada simples. O meio de fermentação contendo hidrolisado HE-5Pil/AQ como fonte de carbono foi adicionado, suplementado (SANTOS *et al.*, 2015) com (g/L): extrato de levedura (3,0); Uréia (2,3) e MgSO4 (1,0) com a vazão de 0,03 L/h durante 15h para completar o volume de fermentação. A agitação foi mantida em 200 rpm e aeração de 0,1 Lpm. Após o tempo final de processo (48h), o vinho levedurado foi drenado do biorreator de forma asséptica via bomba peristáltica e centrifugado a 8000 rpm por 20 min. O creme de leveduras foi resuspendido em água esterilizada, bombeado de volta para o biorreator e submetido ao tratamento ácido.

O tratamento ácido foi realizado pela adição de ácido sulfúrico (2 mol/L), até pH 2,5, na temperatura de 30°C e agitação 200 rpm, com a injeção de 0,2 vvm de ar por 30 min. As células após o tratamento ácido serviram de inóculo para a batelada alimentada subsequente. Esse procedimento foi repetido quatro vezes, com decréscimo sequencial de 1°C na temperatura de trabalho, sendo cada batelada realizada nas temperaturas de 30°C, 29°C, 28°C e 27°C. Amostras foram coletadas no ponto zero e a cada 4h durante todo o ciclo.

### 4.13.4 Fermentação em *shaker* com *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907

- Microrganismo e meio de cultura: A linhagem de *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 utilizada foi mantida em estoque em meio liquido YPX (extrato de levedura/ peptona/ xilose) e glicerol (50%) a - 80°C.

Com o intuito de reativação celular do meio de conservação, 2 mL da cepa estoque *S. passalidarum* foi transferida para um erlenmeyer de 0,25 L contendo 0,1 L de meio YPX (em g/L): extrato de levedura (10,0); peptona (20,0) e xilose, (20,0) e cultivadas em shaker por 24 horas a 30°C e 200rpm. As células a partir desse pré-inóculo foram recuperadas por centrifugação, ressuspendidas em 0,025 L de água esterilizada e transferidas para um Erlenmeyer de 1 L contendo 0,25 L de meio constituído por (em g/L): extrato de levedura (3,0); ureia (2,3); $MgSO_4$ (1,0); xilose (12); glicose (1,32) e o inóculo. O inóculo foi cultivado em incubador rotatório a 30° C e 200 rpm por 24h. As células foram colhidas por centrifugação a 8000 rpm, 10°C por 20 min e suspensas em água de torneira esterilizada no volume adequado para a próxima etapa.

- Fermentação: A fermentação foi realizada em frascos erlenmeyer de 1 L, contendo 0,4 mL de meio de cultura, a 30 °C, 200 rpm e cultivadas em incubador rotatório por 48h. Os meios utilizados para a fermentação de *S. passalidarum* são apresentado na Tabela 3 (SANTOS *et al*, 2015; HOU, 2012 - modificado). Como fonte de carbono foram utilizados o hidrolisado proveniente da hidrolise enzimática da polpa do Ens. 5Pil/AQ [HE- 5Pil/AQ] concentrado e uma amostra denominada controle [C], com açúcares glicose e xilose comercial.

**Tabela 3**. Volumes (mL) das soluções para a composição do meio de fermentação utilizado para fermentação por *S. passalidarum.*

| | **Fermentações** | | |
|---|---|---|---|
| | Controle | Hidrolisado* | Conc. final no meio de fermentação (g/L) |
| **$MgSO_4$ (30 g/L)** | 13,3 mL | 13,3 mL | 1 |
| **Ureia (100 g/L)** | 9,2 mL | 9,2 mL | 2,3 |
| **Extrato de levedura** | 1,2 g | 1,2 g | 3 |
| **Licor** | - | 167 mL | - |
| **Xilose (500g/L)** | 14 mL | - | 17,4 |
| **Glicose (500g/L)** | 35 mL | - | 44,2 |
| **Água** | 285 mL | 167 mL | - |
| **$NH_4Cl$ (30g/L)** | 4 mL | 4 mL | 0,3 |
| **Inóculo** | 40 mL | 40 mL | - |

*Hidrolisado concentrado contendo 106 g/L de glicose e 40,8 g/L de xilose.
**Nota:** Amostragem realizada a cada 4h de fermentação. Foi utilizado um antibacteriano Ampicilina (100mg/mL) na proporção de 1µL por mL de meio.

### 4.13.5 Fermentação em Batelada alimentada com reciclo de células, utilizando *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907

- Microrganismo e meio de cultura: Foi utilizada a mesma linhagem de *Spathaspora passalidarum NRRL Y-27907*. A reativação das células e o crescimento do inóculo foram realizados conforme descrito anteriormente e as células obtidas foram ressuspendidas em volume adequado de água estéril para seguir a etapa de propagação. A propagação foi realizada para obtenção de volume e massa celular suficiente para a fermentação em biorreator.

- Propagação: A propagação foi realizada em biorreator (Bioflo® 115, 7L, New Brunswick). O meio de crescimento continha (g/L): xarope de cana de açúcar (ART: 30,0), $KH_2PO_4$ (2,0) ureia (5,0), $NH_4Cl$ (0,3) e o inóculo (SANTOS *et al*, 2015; HOU, 2012 - modificado). Após o consumo total dos açúcares redutores (ART) (aproximadamente 11 h) foi adicionado um pulso (g/L) de $KH_2PO_4$ (2,0) e ureia (5,0) e foi estabelecida uma alimentação contínua de xarope de cana de açúcar com vazão de 3 g ART/L.h a fim de manter o crescimento linear (SANTOS *et al.*, 2015). A porcentagem de oxigênio dissolvido foi mantida entre 40 e 50% da saturação para evitar a limitação de oxigênio.

Após o tempo de processo (28h), cessou-se a alimentação e o meio foi centrifugado de maneira estéril a 8000 rpm por 20 min. Após a centrifugação, as células foram ressuspendidas em um volume mínimo de água esterilizada. O creme de levedura obtido foi armazenado a 4°C e serviu para as etapas posteriores.

- Fermentação em batelada alimentada com reciclo de células

Os ensaios foram realizados em biorreatores (Bioflo® 115, 1.4L, New Brunswick) com volume de trabalho final de 0,7 L e pH 5 utilizando reciclos de células consecutivos. O creme de leveduras obtido na etapa da propagação ocupou 1/3 do volume de trabalho (0,23L). A alimentação foi realizada nas primeiras 15 h, sendo realizada nas horas seguintes (até 48 h) fermentação em batelada simples. O meio de fermentação contendo hidrolisado HE-5Pil/AQ como fonte de carbono foi adicionado, suplementado com (g/L): extrato de levedura (3,0); Uréia (2,3), $MgSO_4$ (1,0) e $NH_4Cl$ (0,3) com a vazão de 0,03 L/h durante 15h para completar o volume de fermentação (SANTOS *et al*, 2015; HOU, 2012 - modificado). A agitação foi mantida em 200 rpm **sem aeração**. Após o tempo final de processo (48h), o vinho levedurado foi drenado do biorreator de forma asséptica via bomba

peristáltica e centrifugado a 8000 rpm por 20 min. O creme de leveduras foi resuspendido em água esterilizada, bombeado de volta para o reator e submetido ao tratamento ácido.

O tratamento ácido foi realizado pela adição de ácido sulfúrico (2 mol/L), até pH 2,5, na temperatura de 30°C e agitação 200 rpm, com a injeção de 0,2 vvm de ar por 30 min. As células após o tratamento ácido serviram de inóculo para a batelada alimentada subsequente. Esse procedimento foi repetido quatro vezes, com decréscimo sequencial de 1°C na temperatura de trabalho, sendo cada batelada realizada nas temperaturas de 30°C, 29°C, 28°C e 27°C. Amostras foram coletadas no ponto zero e a cada 4h durante todos os ciclos.

- Determinação de massa seca de células

As concentrações de levedura foram medidas por análise gravimétrica, em triplicata. O volume de 2 mL de cada amostra foi aliquotado em tubo Eppendorf® pré-pesado e submetido a centrifugação (14000 rpm, 3 min). O sobrenadante foi reservado para análises de concentrações. As células precipitadas foram ressuspensas em água destilada e novamente centrifugadas nas mesmas condições. As células lavadas foram direcionadas para estufa de secagem da biomassa a 80°C por 24h e pesadas posteriormente.

A viabilidade foi verificada por microscopia óptica utilizando lente objetiva com aumento de 40X, considerando células viáveis, não viáveis e brotamentos. Em diluições adequadas, a contagem foi realizada usando câmara de Neubauer e azul de metileno para diferenciar células vivas de células mortas.

- Concentração de substratos e produtos

Os sobrenadantes das amostras de fermentação foram submetidos a análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para determinar as concentrações de carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos como descrito no item 4.3.

# 5 Resultados e Discussão

## 5.1 Planejamento Experimental $2^3$ do pré-tratamento NaOH/AQ

O planejamento fatorial $2^3$ com 3 replicatas no ponto central para o pré-tratamento com hidróxido de sódio/ antraquinona, foi realizado variando os parâmetros de tempo de reação, temperatura e concentração de NaOH, mantendo-se a proporção de antraquinona fixa em 0,15% (m/m).

A Tabela 4 mostra as condições operacionais de pré-tratamento estudadas, e as variáveis de resposta obtidas para todos os experimentos previstos no planejamento experimental. Como variáveis de resposta foram avaliadas a solubilização dos principais componentes (celulose, lignina e hemicelulose) e, a conversão enzimática da polpa obtida.

**Tabela 4.** Condições operacionais de pré-tratamento estudadas, porcentagem de solubilização de celulose, hemicelulose, lignina e conversão enzimática após pré-tratamentos com NaOH/AQ nas condições previstas no planejamento experimental.

| Ensaios | Tempo (min) | Temp. (°C) | NaOH (%, m/v) | **Solubilização** | | | **Conversão Enzimática (%)** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | **Celulose (%)** | **Hemicelulose (%)** | **Lignina (%)** | |
| 1 | 30 | 130 | 0,5 | 13,8 | 22,2 | 15,3 | 25,7 |
| 2 | 90 | 130 | 0,5 | 11,9 | 12,3 | 10,7 | 26,0 |
| 3 | 30 | 170 | 0,5 | 11,4 | 35,3 | 30,4 | 26,0 |
| 4 | 90 | 170 | 0,5 | 18,3 | 44,3 | 38,1 | 26,9 |
| **5** | **30** | **130** | **1,5** | **19,9** | **41,9** | **73,7** | **64,5** |
| 6 | 90 | 130 | 1,5 | 22,5 | 41,8 | 68,3 | 58,1 |
| **7** | **30** | **170** | **1,5** | **15,7** | **47,5** | **81,0** | **48,3** |
| 8 | 90 | 170 | 1,5 | 23,3 | 51,2 | 76,0 | 56,1 |
| 9 | 60 | 150 | 1,0 | 17,8 | 39,8 | 66,4 | 52,3 |
| 10 | 60 | 150 | 1,0 | 20,7 | 42,8 | 67,5 | 52,6 |
| 11 | 60 | 150 | 1,0 | 19,9 | 42,8 | 66,8 | 52,1 |
| Media PC | | | | 19,5 | 41,8 | 66,9 | 52,3 |

As condições do Ensaio 5 (130°C, 30 min, 1,5% m/v NaOH, 0,15% m/m AQ) e do Ensaio 7 (170°C, 30 min, 1,5 % NaOH (m/v), 0,15% m/m AQ) foram eleitas para os

ensaios de ampliação de escala por apresentarem, respectivamente, maior conversão enzimática da polpa obtida (64,5%) e maior solubilização de lignina (81,0 %).

O apêndice A traz um artigo publicado com a análise estatística do planejamento experimental do pré-tratamento.

## 5.2 Pré-tratamento em escala piloto

Os experimentos em escala piloto foram realizados nas duas condições eleitas no planejamento, com e sem a adição de antraquinona, visando avaliar a ação desta no pré-tratamento. Os experimentos em escala piloto foram denominados: Ens 5Pil/AQ (130°C, 30 min, 1,5% m/v NaOH, 0,15% m/m AQ); Ens 5Pil/SAQ (130°C, 30 min, 1,5% m/v NaOH, sem uso de AQ); Ens 7Pil/AQ (170°C, 30 min, 1,5% m/v NaOH, 0,15% m/m AQ) e Ens 7Pil/SAQ (170°C, 30 min, 1,5% m/v NaOH, sem uso de AQ).

Os pré-tratamentos foram realizados em duplicatas para cada condição, todas as frações foram recolhidas e caracterizadas para a determinação do balanço de massa do processo: a fração sólida (polpa) rica em carboidratos, a fração líquida (licor negro) rico em lignina, incluindo as águas de lavagem da polpa e a água de lavagem da lignina após sua precipitação. As rampas de aquecimento e resfriamento e o fator de severidade dos pré-tratamentos realizados encontram-se no apêndice B.

### 5.2.1 Fração sólida

#### 5.2.1.1 Caracterização química

Após cada ensaio de pré-tratamento, a polpa celulósica foi caracterizada quimicamente quanto a sua composição. A Tabela 5 apresenta os resultados de caracterização química para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e para cada uma das polpas obtidas nos ensaios realizados em escala piloto. Os valores apresentados são a média da composição das polpas obtidas nos experimentos em duplicata. O rendimento mássico para cada condição de reação também é apresentado.

**Tabela 5.** Rendimento em massa, média e desvios da composição para bagaço *in natura* e polpas obtidas nos pré-tratamentos.

| **Ensaio** | Bagaço de cana ***in natura*** (%) | 7Pil/ $S_{AQ}$ | **7Pil/ AQ** | 5Pil/ $S_{AQ}$ | **5Pil/ AQ** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Rendimento em massa (%)** | | 52,7±2,9 | **53,2±0,3** | 52,2±1,6 | **64,0±0,7** |
| **Celulose (%)** | 42,6 ± 0,1 | 63,1 ± 3,8 | **67,0 ± 0,5** | 58,6 ± 1,2 | **60,5 ± 1,1** |
| **Hemicelulose (%)** | 26,2 ± 0,5 | 21,1 ± 1,5 | **22,8 ± 1,5** | 22,1 ± 1,4 | **24,1 ± 0,5** |
| **Lignina (%)** | 22,5± 0,3 | 7,1 ± 2,0 | **5,3 ± 1,8** | 8,8 ± 0,9 | **9,4 ± 0,1** |
| **Cinzas (%)** | 4,3 ± 0,1 | 8,3 ± 2,7 | **3,51 ± 0,5** | 10,0 ± 0,4 | **6,3 ± 2,8** |
| **Extrativos (%)** | 5,3 ± 0,5 | NA | **NA** | NA | **NA** |
| **Total** | 100,9 ± 1,5 | 99,6 ±2,5 | **98,6±1,0** | 99,5 ±1,0 | **100,3±1,1** |

5Pil: (130°C, 30 min, 1,5% NaOH m/v); 7Pil: (170°C, 30 min, 1,5% NaOH m/v);
/AQ: pré-tratamento com adição de antraquinona; /$S_{AQ}$: pré-tratamento sem o uso de antraquinona.

A composição química encontrada para o bagaço *in natura* corrobora com os apresentados na literatura (ROCHA *et al.*, 2015a; ROCHA *et al.*, 2012b; MARTÍN *et al.*, 2006).

Para as reações realizadas na condição do Ens 7Pil, a 170°C, o rendimento em massa médio foi de 53%, independente do uso da antraquinona, obtendo-se cerca de 6,4 kg de polpa partindo de 12 kg de bagaço *in natura*. Para as reações realizadas na condição do Ens 5Pil, a 130°C, houve diferença no rendimento, sendo maior para aquela com utilização da antraquinona, tendo sido obtido aproximadamente 7,7 kg de polpa em cada uma das reações realizadas nessa condição.

As reações da antraquinona durante o processo soda consistem basicamente na oxidação dos polissacarídeos e na hidrólise de ligações éteres da lignina. A antraquinona causa a oxidação do grupo redutor dos carboidratos, estabilizando-os em relação às reações de despolimerização terminal (reações de peeling). Essa estabilização resulta em proteção destes contra reações de degradação e solubilização, consequentemente, causando um aumento do rendimento (GOMIDE; OLIVEIRA, 1979; JERÔNIMO, 2000).

Para a reação realizada a 170°C, não se observa esse aumento do rendimento com o uso da antraquinona, pois a conservação da cadeia de celulose é menor que a observada para a reação a 130°C e, a 170°C também se observa a ação da antraquinona sobre a lignina, aumentando a taxa de deslignificação.

Provavelmente, a menor conservação da celulose nas reações com antraquinona a 170°C é devido à intensificação das reações de peeling com o aumento da temperatura e

também à ocorrência das reações de peeling secundário, que se dão acima de 150°C. Enquanto a adição de AQ na reação a 130°C ajuda a prevenir 67% da solubilização de celulose, na reação a 170°C a adição da AQ previne a solubilização de apenas 28% de celulose.

A ação da antraquinona sobre a lignina é explicada pela reação de hidrólise das ligações ß-éter, ocasionando a formação de fragmentos de lignina de menor massa molecular, o que resulta em uma intensificação da taxa de deslignificação e remoção desta. Observa-se um aumento de 5% na deslignificação com a adição de AQ na reação a 170°C.

As polpas obtidas a 170°C apresentaram maior teor de celulose e menor teor de lignina que as obtidas a 130°C. Entretanto, para melhor comparação, faz-se o cálculo da porcentagem de solubilização dos componentes, levando em consideração o rendimento da reação e a comparação com os valores de composição do bagaço *in natura*. A Tabela 6 abaixo mostra a porcentagem de solubilização dos principais componentes para cada uma das condições estudadas.

**Tabela 6.** Solubilização dos principais constituintes.

| Solubilização de Componentes (%) | 7Pil/ $S_{AQ}$ | **7Pil/AQ** | 5Pil/ $S_{AQ}$ | **5Pil/AQ** |
|---|---|---|---|---|
| Celulose | 22,8 | **16,3** | 28,2 | **9,2** |
| Hemicelulose | 57,9 | **53,8** | 56,1 | **41,1** |
| Lignina | 83,7 | **87,6** | 79,6 | **73,3** |

/AQ: pré-tratamento com soda com adição de antraquinona
/SAQ: pré-tratamento com soda sem adição de antraquinona

Com base nos resultados experimentais apresentados nas Tabelas 5 e 6 é possível observar que no Ensaio 7Pil/$S_{AQ}$ obteve-se uma polpa com uma média de 63% de celulose, 21 % de hemicelulose e 7% de lignina, indicando que em média 22,8 %, 57,9 % e 83,7 % da massa de celulose, hemicelulose e lignina inicial respectivamente, foram solubilizadas para a fração líquida durante o processo de pré-tratamento.

A adição de antraquinona na reação a 170°C não contribuiu de maneira significativa na conservação da celulose, apresentando a polpa obtida no ensaio 7Pil/AQ uma média de 67% de celulose, 23 % de hemicelulose e 5% de lignina, indicando que ainda ocorre a solubilização de aproximadamente 16,3% da celulose, 53,8% da hemicelulose e 87,6% da lignina inicialmente presente no material in natura.

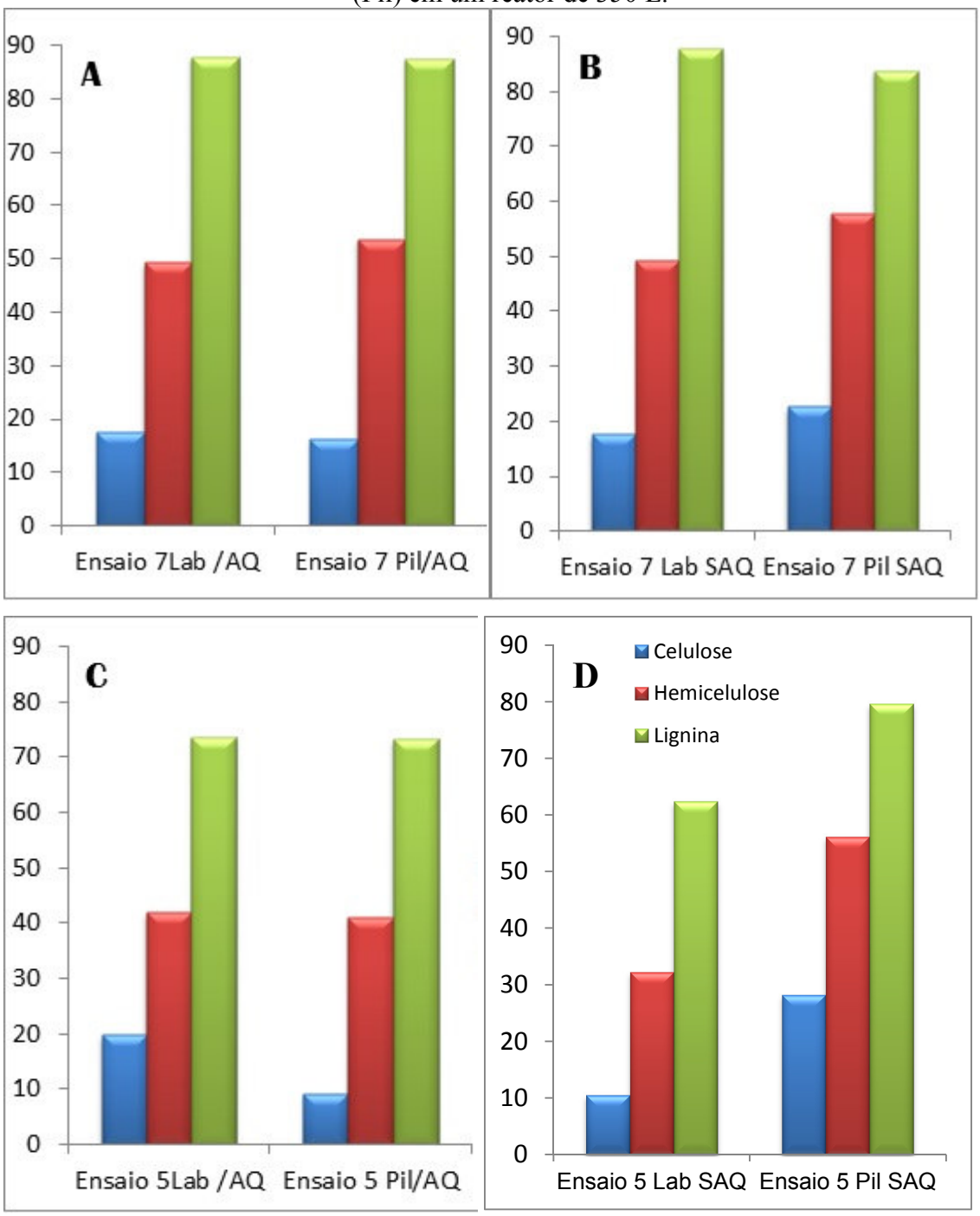
Para o ensaio 5Pil/$S_{AQ}$, obteve-se uma polpa com uma média de 57% de celulose, 22 % de hemicelulose e 9% de lignina, tendo solubilizado em média 28,2 %, 56 % e 79,6%

da massa, respectivamente, de celulose, hemicelulose e lignina durante o processo. Essa reação, que é realizada a 130°C, solubiliza mais celulose e menos lignina que as reações feitas a 170°C, mantendo a mesma média de rendimento que estas. Com o ensaio 5Pil/AQ, é possível observar a contribuição da antraquinona na preservação da celulose e hemicelulose, tendo sido a menor solubilização desses componentes obtida nessa condição, 9,2 % e 41% respectivamente. A adição da antraquinona ajudou a prevenir 67% da solubilização de celulose comparada a reação na mesma condição sem o uso da antraquinona. Sendo importante no pré-tratamento expor as fibras de celulose sem perdê-las, visto que serão utilizadas para a produção de etanol, vê-se um ponto positivo para tal condição.

Tendo gerado uma polpa com uma média de 60% de celulose, 24 % de hemicelulose e 9% de lignina, a condição de ensaio 5Pil/AQ solubilizou apenas 9,2% da celulose inicial e 41% da hemicelulose. Entretanto, é preciso ressaltar que essa também é a condição que solubilizou menor porcentagem de lignina, 73,3%, sendo necessário verificar a interferência desta lignina, ainda presente na polpa, na etapa de hidrólise enzimática subsequente.

Para analisar o efeito da ampliação de escala na solubilização de componentes das polpas nas condições estudadas, a Figura 19 apresenta os dados comparativos de solubilização de celulose, hemicelulose e lignina para os ensaios realizados em escala laboratorial em reator de 2L e em escala piloto em reator de 350 L.

**Figura 19**. Comparação da solubilização de celulose, hemicelulose e lignina para os ensaios realizados em escala laboratorial (Lab) em um reator de 2 L e em escala piloto (Pil) em um reator de 350 L.




**A.** Comparação do Ensaio 7 (170°C, 1,5% NaOH, 30 min com adição de AQ); **B.** Comparação do Ensaio 7 (170°C, 1,5% NaOH, 30 min Sem uso de AQ); **C.** Comparação do Ensaio 5 (130°C, 1,5% NaOH, 30 min com adição de AQ); **D.** Comparação do Ensaio 5 (130°C, 1,5% NaOH, 30 min Sem adição de AQ).
Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 19 (**A** e **B**), quanto aos Ensaios 7/AQ e 7/$S_{AQ}$, é possível observar que a solubilização de lignina durante os processos em escala piloto e laboratório, apresentou-se praticamente inalterada, com uma média de 85% deste componente solubilizado. Quanto à hemicelulose foram observadas maiores solubilizações desses constituintes nos ensaios realizados em escala piloto, sendo praticamente 1,2 vezes maior que a solubilização dessa fração na reação em escala laboratorial. Já para a celulose, na reação 7/$S_{AQ}$, a solubilização de celulose foi 1,2 vezes maior para a escala piloto que em laboratório, porém, na reação 7/AQ feita em escala piloto foi possível observar melhor o efeito da AQ na preservação desta, mantendo a mesma perda da reação em laboratório.

Na análise do Ensaio 5/AQ, Figura 19(C), pode-se observar uma melhor reprodutibilidade dos dados, tendo as mesmas solubilizações de lignina e hemicelulose em laboratório e na escala piloto. Nessa reação também se observa melhor o efeito da antraquinona na preservação da celulose em escala piloto que em laboratório, sendo a perda em laboratório 2,1 vezes maior que na escala piloto.

Essas diferenças nas solubilizações podem ser atribuídas ao sistema de agitação do reator em escala piloto, que promove uma mistura mais eficiente, e assim, uma maior interação da antraquinona com a celulose.

Provavelmente, as maiores perdas nas reações piloto do Ensaio 7 se dão pelo maior tempo gasto para o resfriamento do reator, após a reação. Sendo o ensaio 7 realizado a 170°C, o tempo aproximado é de 25 min até que o reator atinja a temperatura de 100°C, quando é descarregado. Para as reações do ensaio 5, a 130°C, esse tempo é em torno de 15 minutos (Vide rampas de aquecimento e resfriamento do reator, severidade do processo no Apêndice B). Já para as reações em laboratório, esse resfriamento é feito de forma rápida em banho de gelo.

Mesa *et al.* (2011) realizaram ensaios de pré-tratamento com ácido sulfúrico em um reator semi-piloto de 10L com injeção direta de vapor e obteveram rendimentos de glicose similares aos obtidos em escala laboratorial em autoclave. Tendo realizado pré-tratamento com ácido sulfúrico seguido por tratamento organosolv, obteveram rendimento em glicose após a hidrólise enzimática de 29,7g de glicose /100g de bagaço para o experimento em escala piloto e; muito similar obteveram 29,1g de glicose/100g de bagaço para o experimento em autoclave, demonstrando um scale-up bem sucedido do processo para a recuperação de glicose a partir de bagaço de cana.

Rocha e colaboradores (2012a) realizaram reação de deslignificação com solução de hidróxido de sódio em bagaço de cana pré-tratado por explosão, em um reator de 350L,

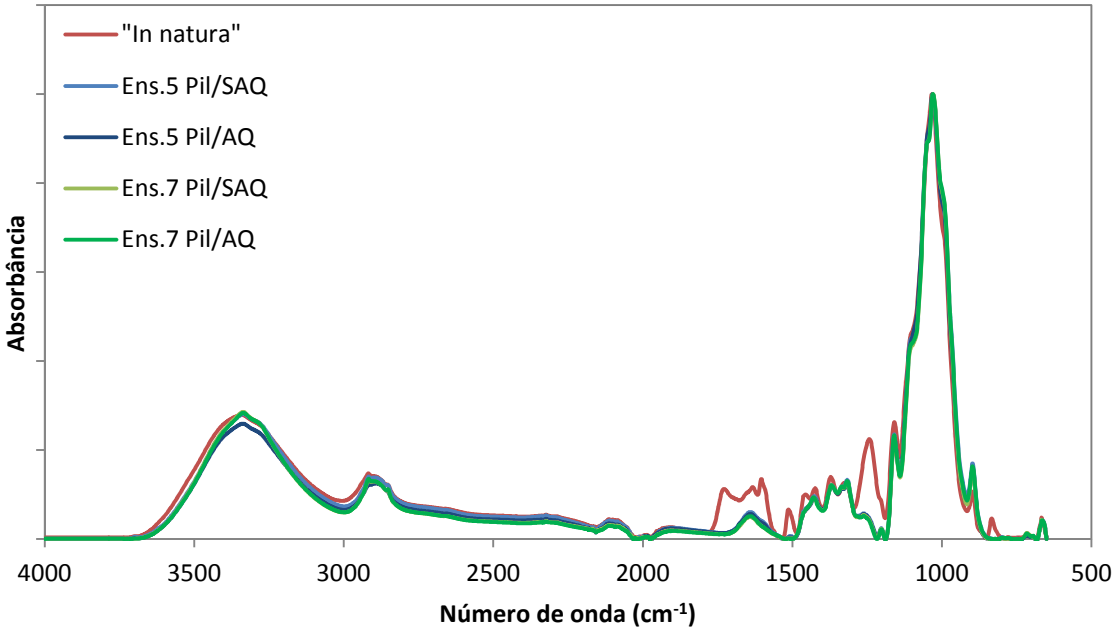
a 100°C e 60 min. A partir dos dados de balanço relataram que os dois processos resultaram em 17% de solubilização de celulose.

Considera-se bastante satisfatória a reprodutibilidade dos resultados encontrados nesse projeto, para os resultados de pré-tratamento realizados em escala piloto e em escala de laboratório.

#### 5.2.1.2 Espectroscopia de Infravermelho

O material *in natura* e as polpas obtidas após cada pré-tratamento foram analisadas por espectroscopia de infravermelho, e os espectros obtidos na região de 4000-650 $cm^{-1}$ estão apresentados na Figura 20.

**Figura 20**. Espectro na região do infravermelho do material in natura e das polpas obtidas nos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/AQ.

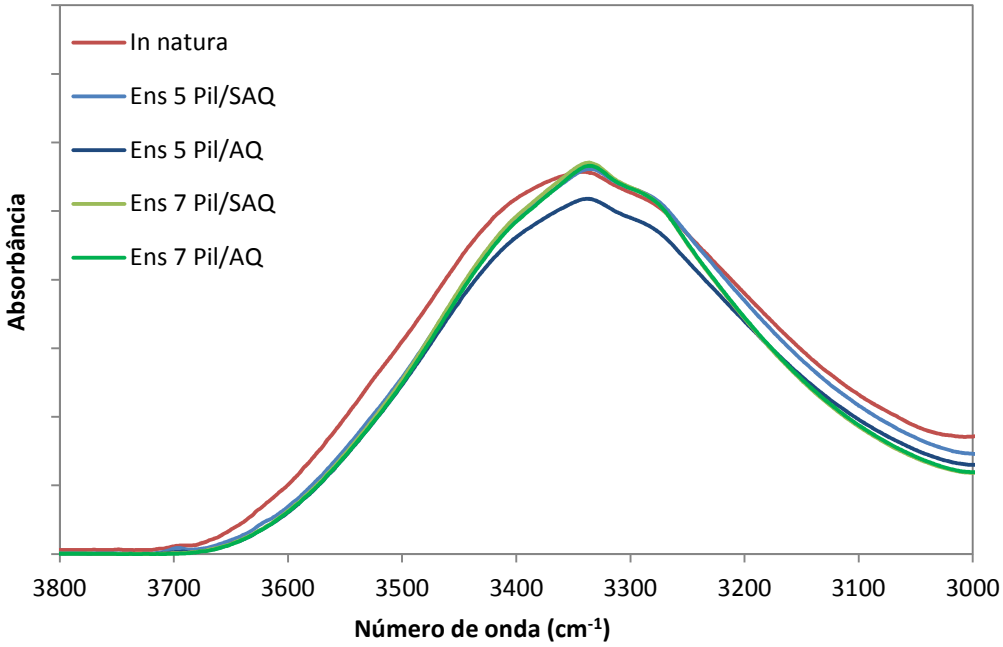



Fonte: Próprio autor.

A análise FTIR evidencia a capacidade de diferentes bandas caracterizarem o grau de ordenação da celulose (Figura 20). Uma alteração na organização cristalina faz com que o perfil espectral das amostras seja alterado através da redução ou aumento da intensidade ou mesmo o desaparecimento e surgimento de picos característicos das amostras.

O pico na região de 3337 $cm^{-1}$ é atribuído a um estiramento vibracional OH e pode ser correlacionada com a cisão das ligações de hidrogênio da celulose (He *et al*., 2008). (Figura 21)

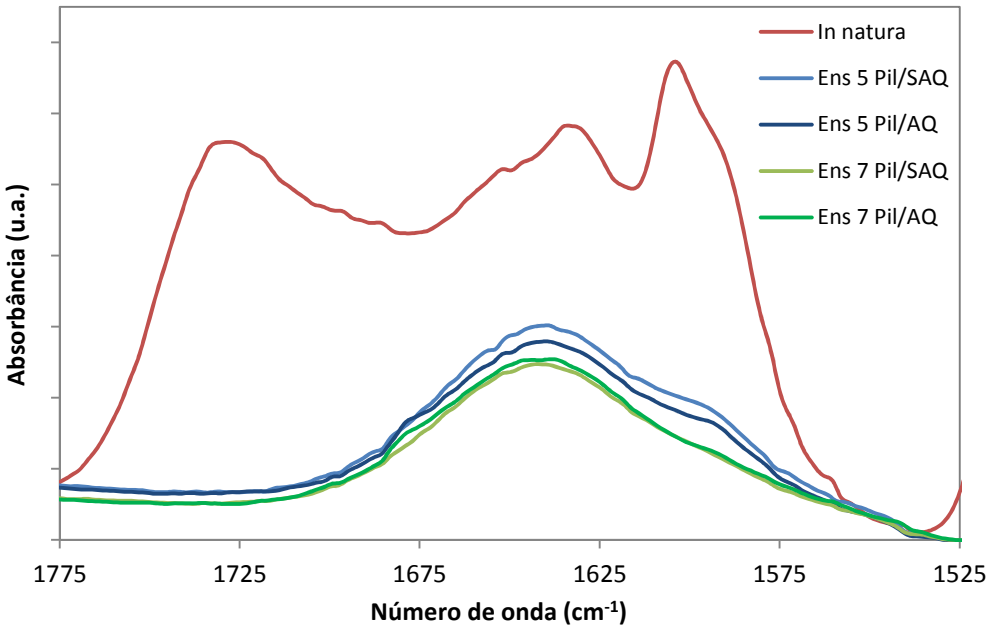
**Figura 21**. Espectro na região do infravermelho com ampliação na banda 3337 $cm^{-1}$ do material in natura e das polpas obtidas nos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/AQ.




Fonte: Próprio autor.

Na região de 1604 $cm^{-1}$ tem-se a banda relacionada com as vibrações do anel aromático da lignina e a sua alteração ou redução pode ser atribuída a reações de condensação e/ou quebra das cadeias alifáticas laterais da lignina (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), estando assim correlacionada com a porcentagem de deslignificação do material lignocelulósico durante o processo de deslignificação. De acordo com o espectro ampliado, Figura 22, a banda de 1604 $cm^{-1}$ apresenta-se significativamente definida para o material in natura e quase ausente para as polpas obtidas após os pré-tratamentos. Confirmando assim o decréscimo dessa banda com a taxa de deslignificação do material (XU *et al*., 2008). Olhando apenas para os espectros das polpas, vê-se que os ensaios realizados a 130°C (Ensaios 5), com menor taxa de deslignificação que os ensaios a 170°C (Ensaios 7), ainda apresentam um ombro na região de 1604 $cm^{-1}$.

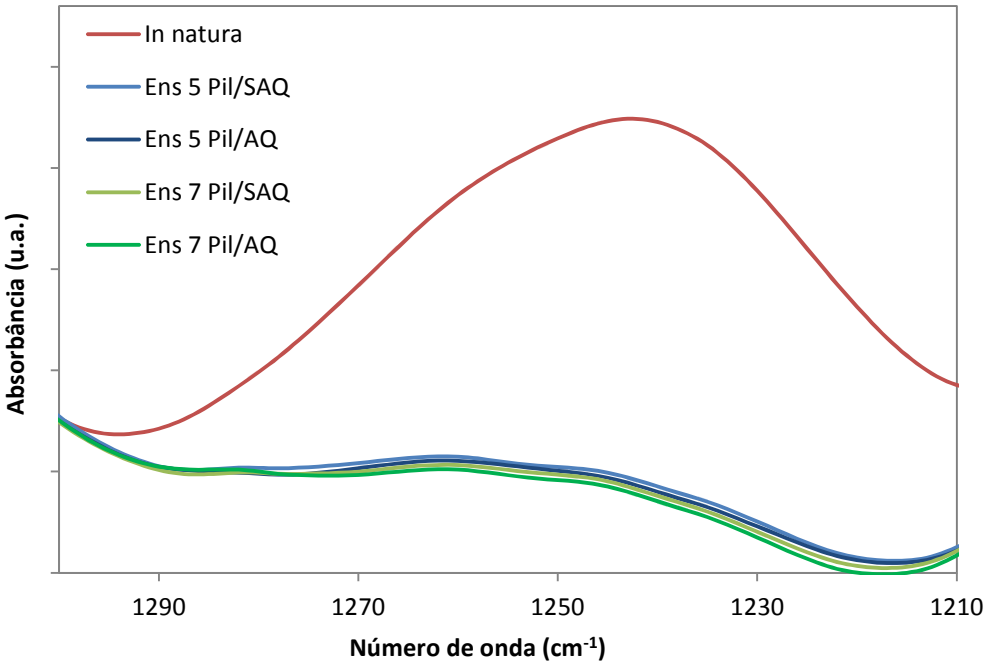
**Figura 22.** Espectro na região do infravermelho com ampliação na banda 1604 $cm^{-1}$ do material in natura e das polpas obtidas nos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/AQ.




Fonte: Próprio autor.

A banda atribuída à quebra ou alteração dos grupos acetilas, localizada na região de 1246 $cm^{-1}$, também sofre reduções de intensidade após o pré-tratamento (SILVERSTEIN e BASSLER, 1994). (Figura 23)

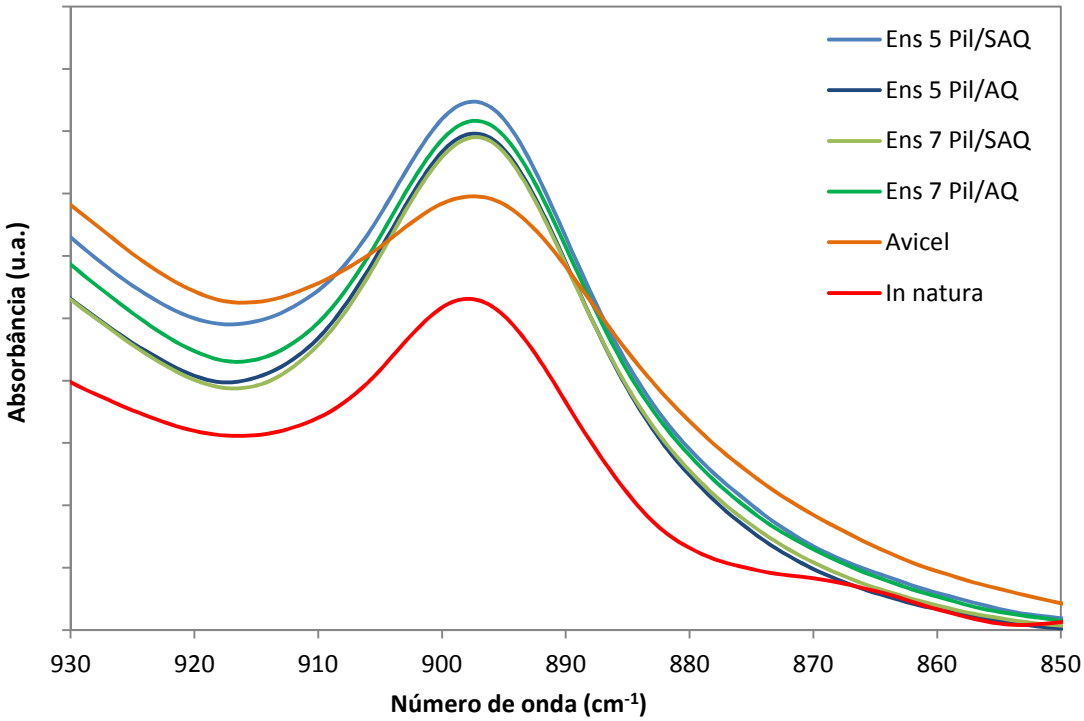
**Figura 23**. Espectro na região do infravermelho com ampliação na banda 1246 $cm^{-1}$ do material in natura e das polpas obtidas nos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/AQ.




Fonte: Próprio autor.

A absorção da banda 897 $cm^{-1}$ é atribuída ao alongamento C-O-C da ligação glicosídica β-(1→4), sendo observado um aumento na intensidade de absorção dessa banda em amostras menos cristalinas (SHI *et al.,* 2012, CIOLACU *et al*., 2011). Para comparação uma celulose comercial Avicel também foi analisada (Figura 24).

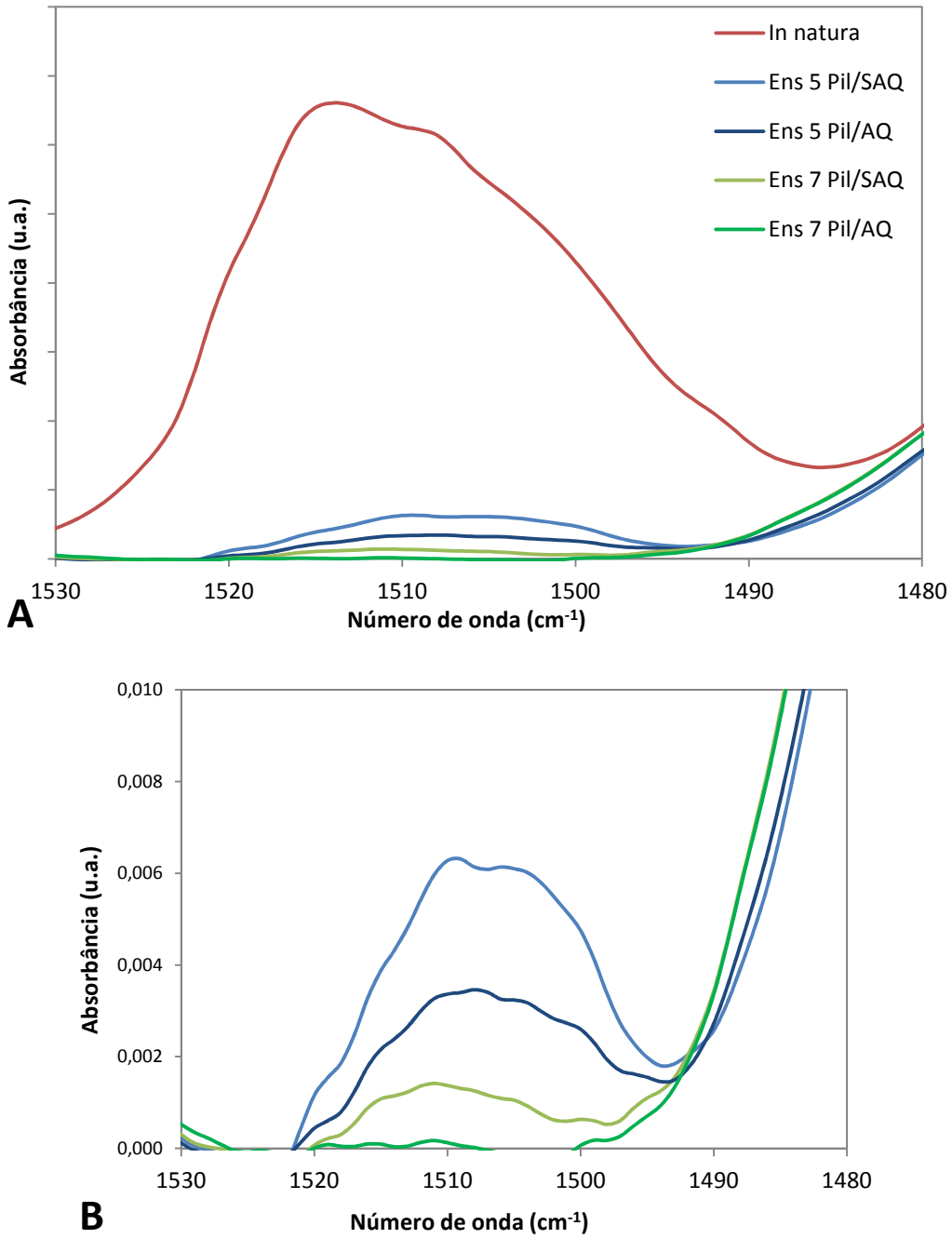
**Figura 24**. Espectro na região do infravermelho com ampliação na banda 897 $cm^{-1}$ das polpas obtidas nos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/AQ, o bagaço *in natura* e uma celulose comercial Avicel.




Fonte: Próprio autor.

A banda em 1510 $cm^{-1}$ é uma banda de anel aromático de lignina com pouca sobreposição de carboidratos, sendo assim uma região favorável para uma correlação com o teor de lignina, conforme pode ser observado pela Figura 25 (A e B). Na Figura 25-A, vê-se a diferença na absorbância deste pico para o material in natura, com teor de lignina de 22% e as polpas, com menos de 10% de teor de lignina. Na Figura 25-B, vê-se a diferença na absorbância deste pico para as polpas obtidas nas diferentes condições. Nas polpas obtidas em maior temperatura (Ensaios 7), a intensidade do pico é menor.

**Figura 25**. Espectro na região do infravermelho com ampliação na banda 1510 $cm^{-1}$.




**(A)** Material in natura e polpas obtidas nos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/AQ. **(B)** Polpas obtidas nos pré-tratamentos com NaOH e NaOH/AQ. Fonte: Próprio autor.

Nota-se que os resultados obtidos no espectro de infravermelho, referente a banda caracteristica localizada na região de 1510 $cm^{-1}$, corroboram com a dimuição do teor de lignina presente na biomassa.

Apesar da tendência do comportamento, observa-se que a banda caracteristica da lignina quase desaparece (absorbância < 0,008) com teores desse componente por volta de 7%. Como o método utilizado para a determinação quantitativa de lignina no material

lignocelulosico se baseia em gravimetria, certamente esse teor remanescente quantificado como lignina e não correspondente a banda do FTIR, reporta o conteúdo de taninos, terpenos ou outros grupos aromáticos, que não são extraidos durante o processo de pretratatmento e que são condensados e quantificados como lignina no processo de caracterização do material. Visto que o espectro de UV-vis de uma solução contendo estes compostos apresenta bandas caracteristicas proximas a 280 nm, banda essa utilizada para a quantificação de lignina solúvel.

Uma tabela com a variação na intensidade de absorção para cada uma das amostras analisadas por FTIR, para cada uma das principais bandas discutidas, é apresentada no Apêndice C.

#### 5.2.1.3 Cristalinidade

A cristalinidade é uma propriedade importante na diferenciação e classificação de materiais celulósicos. French, 2013 e Driemeier, 2013 reportam a complexidade da determinação do chamado índice de cristalinidade de um material devido à dificuldade de definição entre uma estrutura cristalina e amorfa e a linha tênue para uma separação entre elas. Uma quantificação cabível de ser realizada é referente à largura dos cristais de celulose presente em uma determinada amostra. Com base nesse conceito buscou-se identificar o grau de alteração da celulose presente no material após o pré-tratamento através de medidas de infravermelho e medidas de largura de cristal por difratometria de raios-X.

Para a determinação da largura de cristal utilizando raios-X, representando a dimensão lateral do cristal, foi utilizado o pico 200 e aplicada a equação de Scherrer. Este pico é utilizado por ser mais intenso e as sobreposições serem menos críticas que em relação aos picos $1\underline{1}0$ e 110, geralmente utilizados na determinação do Índice de Cristalinidade pelo Método Seagal.

A Tabela 7 mostra os valores calculados, em nanômetros, para a largura do cristal de celulose, no bagaço *in natura* e nas polpas obtidas após cada reação. Esse parâmetro para amostras padrão (Avicel PH-101, α-celulose, Sigmacel tipo 101) e uma polpa de eucalipto, descritos na literatura também são colocados para comparação.

Driemeier e Bragatto (2013) investigam amostras de uma gama de largura de cristal observados em celulose, isolada a partir de plantas, com larguras de cristal ($L_{200}$) medidas

entre 3,2 e 6,1 nm. Em um extremo, materiais como Sigmacel tipo 101 e polpas de bagaço de cana, apresentam valores de $L_{200}$ < 4,0 nm, apenas ligeiramente maior do que os cristais no material in natura. No outro extremo, materiais como papel de filtro, Avicel e Fluka, que são mais puros, apresentam valores de $L_{200}$ > 6,0 nm. Assim, observa-se uma clara tendência de aumento de largura de cristal de acordo com o aumento da pureza do material.

**Tabela 7.** Inferências no Indice de Cristalinidade: Relação entre absorção de bandas do infravermelho e Largura de cristal determinadas por difração de raios-X.

| | FTIR | DRX | Composição | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Amostras | A1108/ A1091 | $L_{200}$ (nm) | Celulose (g/g) | Hemicelulose (g/g) | Lignina g/g |
| Avicel PH-101* | 1,23 | 6,1 | 0,985 | 0,024 | 0 |
| Polpa eucalipto* | 1,03 | 5,6 | 0,830 | 0,148 | 0,022 |
| α-celulose* | 0,96 | 4,5 | 0,810 | 0,199 | 0 |
| Sigmacel tipo 101* | 0,92 | 3,2 | 0,679 | 0,285 | 0,036 |
| Bagaço *in natura* | 0,93 | 2,8 | 0,426 | 0,262 | 0,225 |
| Ens. 5 Pil/AQ | 0,94 | 3,5 | 0,605 | 0,241 | 0,094 |
| Ens. 5 Pil/SAQ | 0,94 | 3,4 | 0,587 | 0,221 | 0,088 |
| Ens. 7 Pil/AQ | 0,97 | 3,9 | 0,670 | 0,228 | 0,053 |
| Ens. 7 Pil/SAQ | 0,96 | 3,7 | 0,631 | 0,212 | 0,071 |

* valores de Driemeier e Bragatto (2013).

Observa-se pela Tabela 7 uma tendência de aumento de largura, quanto maior a porcentagem de celulose na polpa, porém, essa variação é mínima. O material de partida usado, bagaço *in natura*, com 42,6% de celulose, 26,2% de hemicelulose e 22,5% de lignina, apresentou um valor de 2,8 nm para a largura do cristal de celulose. As polpas obtidas por pré-tratamento alcalino em escala piloto não apresentaram um grande ganho de largura de cristal em relação ao material *in natura* nem grande variabilidade entre os ensaios.

Esses valores estão de acordo com o observado para polpas de bagaço por Driemeier, com $L_{200}$ < 4,0 nm. As condições empregadas nos ensaios de pré-tratamento não resultaram em alterações significativas de largura de cristal, com uma média de 3,6 ±

0,2 nm para a largura de cristal de celulose para todas as polpas, independente do uso ou não de antraquinona no processo de pré-tratamento.

Visando uma comparação na inferência da cristalinidade das polpas obtidas, as polpas foram caracterizadas também por espectroscopia de infravermelho (FTIR), de acordo com procedimentos descritos previamente na literatura (GARSIDE; WYETH, 2003; AKERHOLM *et al.,* 2004; LAUREANO-PEREZ *et al*., 2005).

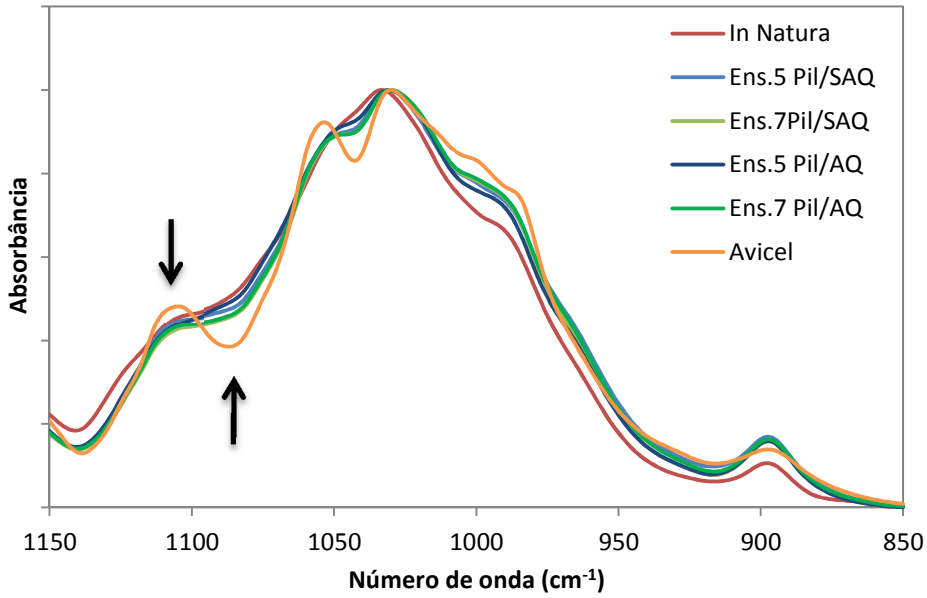
A literatura reporta a determinação da cristalinidade por FTIR através da razão de diferentes picos como A1430/A896; A1430/A1403, A1459/A1403, A1108/A1091, A1595/1105, A 1595/2900, A1370/A670, A1098/A900 (GARSIDE; WYETH, 2003; MARSON *et al*., 1999; AKERHOLM *et al.,* 2004; KUMAR *et al*., 2009; LAUREANO-PEREZ *et al*., 2005).

As polpas obtidas no presente trabalho, apesar de serem provenientes de um processo de deslignificação, apresentam teores significativos de lignina, que acabam por interferir em bandas provenientes da fração de carboidratos da biomassa. O espectro de infravermelho fornece evidências da presença de vários grupos funcionais da lignina, principalmente vibrações do anel aromático na região de 1600 a 1200 $cm^{-1}$, como as bandas: 1422-1430 $cm^{-1}$ referente à vibração do anel aromático com deformação C-H no plano; 1593-1605 $cm^{-1}$ referente à vibração do anel aromático e estiramento C=O; 1370-1365 $cm^{-1}$ referente ao estiramento C-H alifático em $CH_3$ e estiramento OH fenólico (LIN; DENCE, 1992).

Com base nisso elegeu-se bandas as quais os picos estão localizados em regiões preferencialmente de carboidratos com pouca sobreposição/interferência de picos de lignina, como o A1098/900 e o A1106/A1091.

Para a seleção e elucidação do pico de maior confiabilidade utilizou-se o espectro de FTIR de uma amostra de celulose Avicel como padrão. A Figura 26 apresenta as absorbâncias em FTIR na região de 850 a 1150 $cm^{-1}$ das polpas obtidas do pré-tratamento em escala piloto e de uma amostra de celulose Avicel.

**Figura 26.** Espectro de infravermelho na região de 850 $cm^{-1}$ a 1150 $cm^{-1}$ para as polpas obtidas pelo pré-tratamento em escala piloto e uma celulose Avicel.




Fonte: Próprio autor.

No espectro da Figura 26 é notória a presença de um pico e um vale na região de 1110 – 1090 $cm^{-1}$ e visto que a Avicel é considerada uma celulose de alta pureza, baseou-se na relação A1106/A1091 para a análise.

A Tabela 7 apresenta também a cristalinidade por essa relação da absorção das bandas A1106/A1091 do infravermelho para o bagaço *in natura* e para as polpas obtidas após cada reação.

Os valores obtidos por essa técnica apresentaram o mesmo comportamento observado para os resultados de largura de cristal determinado por difração de raios-X, não apresentando grande variabilidade, independente dos ensaios nem em relação ao material *in natura.* O material *in natura* apresentou um valor de 0,93 para a relação A1106/A1091, enquanto as polpas apresentaram um valor médio de 0,95 para a relação, com um desvio de 0,02.

Os parâmetros obtidos pelas duas técnicas (FTIR e DRX) referentes à cristalinidade do material, apresentaram uma boa correlção (apesar de termos apenas 4 pontos para comparação) mostrando que a determinação da cristalinidade por meio da espectroscopia de infravermelho, apesar de ser um método indireto, pode ser uma alternativa, visto que é um método mais simples e, na maioria das vezes, mais acessível que a difratometria de raios-X.

A literatura reporta inúmeros trabalhos correlacionando a influência da cristalinidade do material celulósico na conversão enzimática, entretanto de acordo com Santos *et al*., (2012), a eficiência da conversão enzimática esta correlacionada com diversos fatores que atuam sinergicamente como: a composição química do material, características da lignina e conteúdo de lignina, adsorção da enzima no substrato e a relação grupos siringil/guaiacil como principais fatores.

Embora celulose com elevado teor de material amorfo seja normalmente mais facilmente digerida por enzimas, a acessibilidade da enzima à celulose é afetada não apenas pela cristalinidade, mas também por vários outros parâmetros, como o teor de lignina e hemicelulose, a distribuição destes componentes no material, a porosidade e o tamanho de partícula. Dada a dependência metodológica dos valores de indice de cristalinidade da celulose e a natureza complexa das interações da celulase com a celulose, Park e colaboradores (2010) advertem contra a tentativa de correlacionar mudanças relativamente pequenas no índice de cristalinidade com mudanças na digestibilidade de celulose.

Os resultados apresentados de largura de cristal corroboram com a proposição de Santos (2012) e Park (2010), visto que mesmo uma variabilidade insignificante da largura de cristal (3,4 a 3,9 nm), resultou em distintas conversões de celulose em glicose (de 55 a 72%).

#### 5.2.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

O bagaço *in natura* e as polpas obtidas após os pré-tratamentos em escala piloto foram analisadas quanto a sua ultraestrutura em microscópio eletrônico de varredura. As imagens obtidas são apresentadas a seguir (Figura 27).

A microscopia eletrônica de varredura tem sido usada como uma técnica analítica de grande importância e versatilidade no estudo da ultraestrutura da biomassa (CORRALES *et al.*, 2012). O bagaço in natura (Figura 27 - A, B, C) apresenta uma morfologia rígida e compacta, apresentando elementos típicos, como feixes de fibras e ceras e extrativos depositados na superfície.

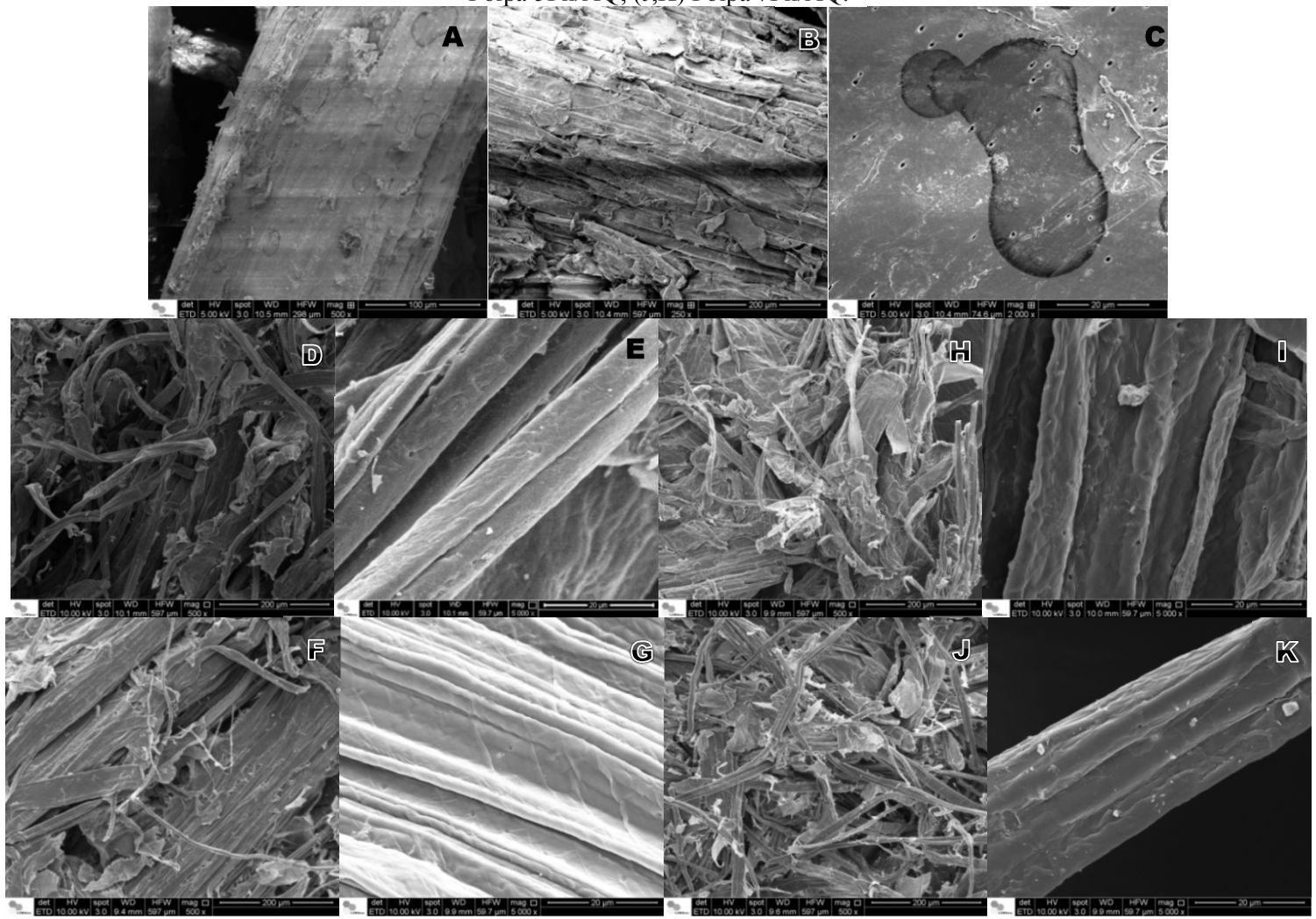
As amostras submetidas ao pré-tratamento com NaOH (Figura 27 - D, E para tratamento a 130°C e F, G para tratamento a 170°C) e NaOH/AQ (Figura 27 - H, I para

tratamento a 130°C e, J, K para tratamento a 170°C) exibiram uma morfologia mais desorganizada, com maior exposição das fibras, com pequenos poros e rupturas na superfície, que revelam a eficácia do processo de pré-tratamento.

Observa-se uma maior desorganização nas fibras obtidas com uso da antraquinona no processo (Figura 27 - H e J) em comparação ás fibras obtidas em processo sem uso da antraquinona (Figura 27 - D e F). Entratanto, não foram observadas diferenças significativas entre as polpas obtidas nas diferentes temperaturas de processo utilizadas (130°C e 170°C).

Segundo Rezende *et al.* (2011) os pré-tratamentos alcalinos tem um efeito notável sobre a morfologia do bagaço, especialmente sobre os feixes de fibras. Mesmo em condições alcalinas mais brandas (concentrações de NaOH inferior a 0,5%) os feixes começam a desmontar exibindo fibras livres. Após o pré-tratamento, a estrutura da parede celular mais exposta permite uma maior acessibilidade para as enzimas hidrolíticas, o que facilita a hidrólise da biomassa lignocelulosica.

**Figura 27.** Micrografias do bagaço e polpas em diferentes ampliações. (A, B, C) Bagaço in natura; (D, E) Polpa 5Pil/SAQ; (F,G) Polpa 7Pil/SAQ; (H, I) Polpa 5Pil/AQ; (J,K) Polpa 7Pil/AQ.




Fonte: Próprio autor

#### 5.2.1.5 Sorção de Vapor Dinâmica

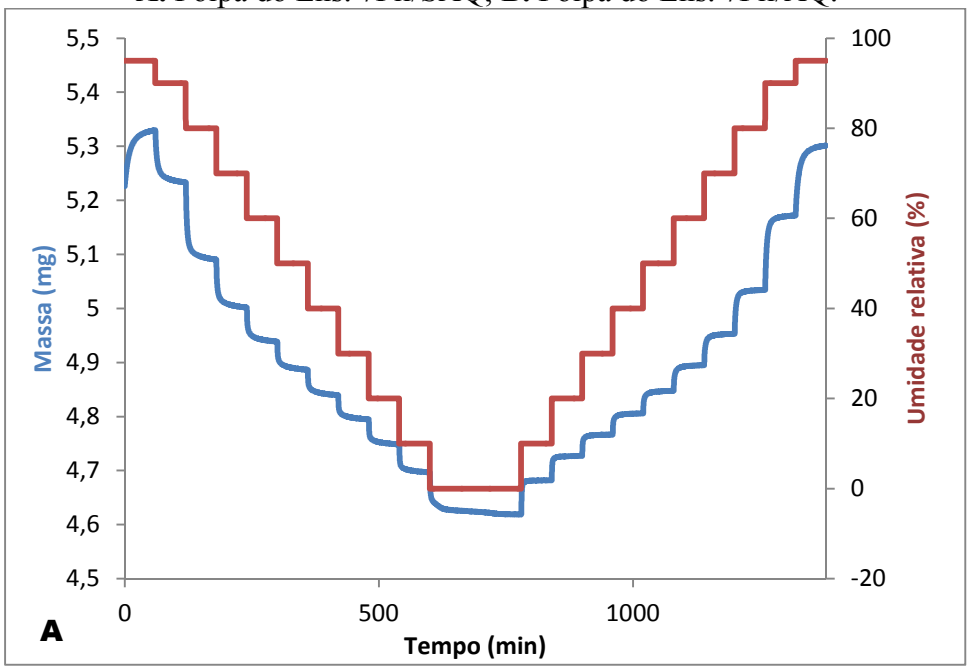
A análise de sorção de vapor dinâmica foi feita segundo Driemeier, Mendes e Oliveira (2012). O teste de sorção de vapor é uma técnica de análise gravimétrica que testa, em uma dimensão complementar, a interação entre a água e a celulose. Em contraste com a maioria dos materiais de engenharia, a estrutura da biomassa vegetal muda de acordo com a disponibilidade de água (BEECHER; HUNT; ZHU, 2008). Água causa inchamento da biomassa, criando poros em que enzimas e reagentes podem ser transportados durante seu processamento. Por isso, a compreensão das interações celulose-água tem importância fundamental e tecnológica. Além disso, a hidratação da celulose varia conforme sua ultraestrutura, pois a massa de água na monocamada varia, dependendo do índice de cristalinidade da celulose; e a hidratação afeta a ultraestrutura da celulose, pois durante o processo de secagem do material, os poros cheios de água podem colapsar (MIHRANYAN *et al.*, 2004; KOCHERBITOV *et al.*, 2008).

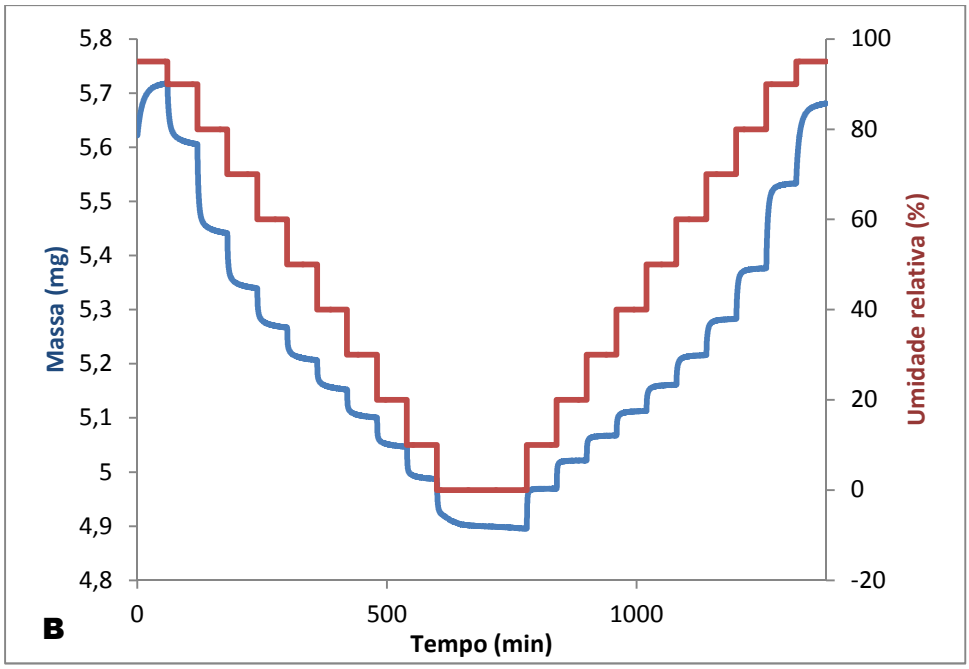
Na análise de sorção de vapor dinâmica, a celulose apresenta um tempo característico geral de dessorção e apresenta tempos característicos altamente variáveis de sorção, o que indica que propriedades específicas dos materiais podem ser inferidas a partir da cinética de sorção (DRIEMEIER; MENDES; OLIVEIRA, 2012).

A Figura 28 apresenta os dados brutos da cinética de sorção e dessorção para as polpas obtidas nos ensaios 7Pil/AQ e 7Pil/SAQ.

Observam-se para cada passo (espaço de tempo em que a amostra é mantida a uma determinada umidade relativa), duas fases. A fase inicial, em que ocorre uma rápida mudança na massa da amostra, e uma segunda, lenta que se estende até o final do passo. O parâmetro ($t_{1/16} - t_{1/8}$), que é o tempo característico da fase lenta da cinética, é calculado para cada umidade relativa a que é submetido, até 80%, tanto para sorção quanto para dessorção.

**Figura 28.** Dados brutos para cinética de sorção de vapor.
**A.** Polpa do Ens. 7Pil/SAQ; **B.** Polpa do Ens. 7Pil/AQ.




Fonte: Próprio autor.

Uma vez que o parâmetro ($t_{1/16} - t_{1/8}$) na dessorção não depende da umidade relativa (h), calculou-se a média e o desvio-padrão desse parâmetro na dessorção nas diferentes umidades relativas ($0{,}1 \leq h \geq 0{,}8$) para as duas polpas analisadas, obtendo-se o valor de 13,5 ± 1,3 min. Esse valor está de acordo com o apresentado por Driemeier (2012) para diferentes celuloses, corroborando seus resultados de que a cinética de dessorção é regida por um fenômeno independente da estrutura de celulose.

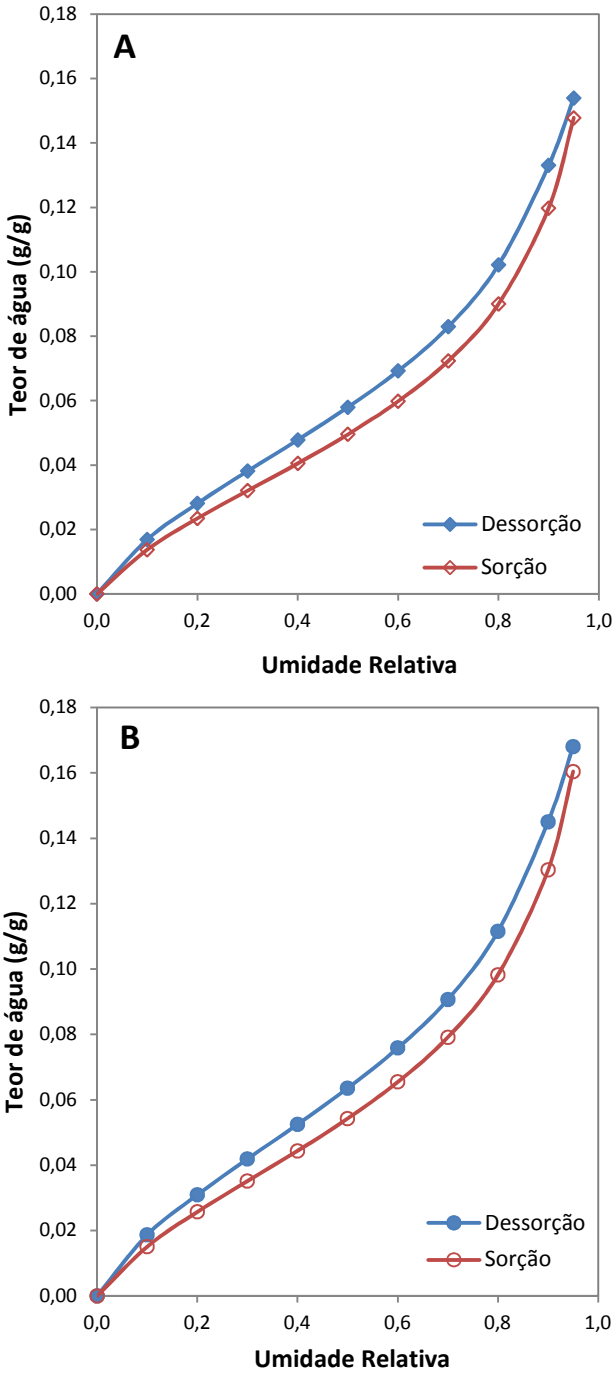
O parâmetro ($t_{1/16} - t_{1/8}$) para sorção também está de acordo com os valores reportados por Driemeier, sendo sistematicamente inferior aos de dessorção, o que implica que a sorção é comparativamente mais rápida que a dessorção. Esse parâmetro na sorção varia em função de h, o comportamento observado para as amostras desse trabalho seguem a tendência observada para a amostra de polpa Kraft branqueada de Eucalipto, reportada por Driemeier, apresentando ($t_{1/16} - t_{1/8}$) a h=0,1 próximo a 2 min, ($t_{1/16} - t_{1/8}$) a h=0,4 próximo a 8,3 min e ($t_{1/16} - t_{1/8}$) a h =0,8 próximo a 6 min. Sendo as polpas analisadas neste trabalho provenientes de tratamento com NaOH para deslignificação direta, existe coerência na semelhança de comportamento com a polpa Kraft (tratamento também alcalino, com objetivo de remoção de lignina) de eucalipto, visto que as outras amostras analisadas por Driemeier eram de celuloses comerciais.

Assim, os parâmetros da cinética de sorção indicam que a estrutura da polpa de bagaço obtida por deslignificação com NaOH se assemelha à polpa Kraft de eucalipto quanto à sorção de água pela monocamada.

A partir dos dados calculados foi construída a isoterma de sorção para as duas amostras analisadas. Isotermas de sorção de água mostram a relação entre a atividade de água e a umidade de equilíbrio de uma amostra a uma determinada temperatura. Cada material tem sua isoterma de sorção própria e única. Devido as diferentes interações (coligativa, capilaridade, e efeito de superfície) entre a água e os componentes sólidos com diferentes teores de umidade. As diferenças na composição química e estrutura física do material influenciam no formato da isoterma.

As isotermas de sorção e dessorção apresentadas na Figura 29 para as polpas analisadas (A - 7Pil/SAQ e B - 7Pil/AQ) são do tipo II - Sigmoide, com duas regiões de inflexão devido às mudanças na magnitude dos efeitos químicos e físicos. Observa-se uma defasagem entre as curvas de sorção e dessorção. Essa defasagem é denominada histerese e pode ocorrer devido a diversos fatores, tais como condensação capilar, mudanças na estrutura física do material, impurezas na superfície e mudança de fase (RAHMAN, 1995).

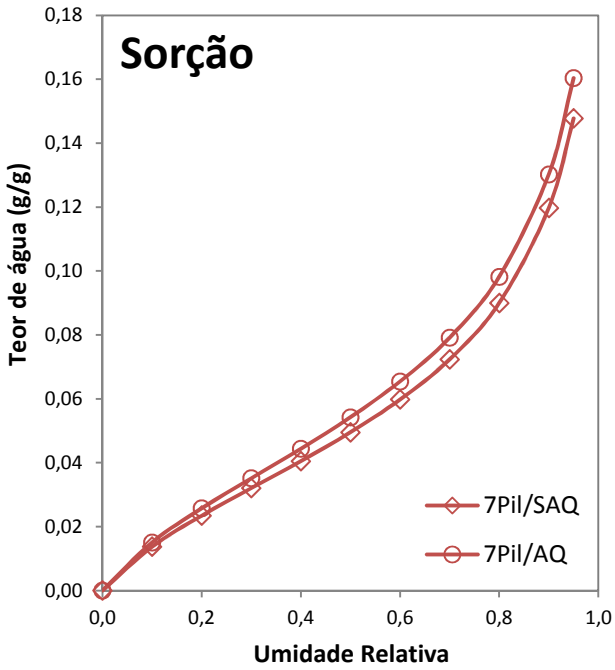
**Figura 29.** Isotermas de sorção e dessorção das duas polpas analisadas.
**A.** 7 Pil/SAQ; **B.** 7 Pil/AQ




Fonte: Próprio autor.

Quando se compara a curva de sorção das duas polpas analisadas, é possível observar que a fibra obtida com o uso de antraquinona no processo (Ens.7Pil/AQ) tem uma capacidade de intumescimento 10% maior que a fibra obtida por pré-tratamento sem AQ (Figura 30).

**Figura 30.** Comparação do perfil de sorção das polpas 7Pil/SAQ e 7Pil/AQ




Fonte: Próprio autor.

Isotermas de sorção podem ser descritas por diversos modelos de equilíbrio termodinâmico. O modelo utilizado foi o de Hailwood-Horrobin. Os parametros obtidos a partir desse modelo são apresentados na Tabela 8. O parâmetro $m_0$ se refere à massa de água por unidade de massa seca de amostra que satura os espaços de sorção na monocamada da superfície sólida, e tem sido relacionada com a cristalinidade da celulose. Entretanto, Kreže *et al*. (2001) relatam, após estudo sobre o comportamento das fibras de celulose na sorção, que as propriedades de adsorção são determinadas pelas regiões amorfas, tamanho e organização dos poros e as propriedades da superfície de interação e, que as regiões cristalinas, o seu tamanho e orientação tem menor influência sobre o carácter de sorção.

$\Delta G_h$ e $\Delta G_d$ são as variações de energia livre padrão (referenciadas em água líquida). Os índices *h* e *d* se referem, respectivamente, à hidratação da monocamada (*h*) e à água dissolvida no sólido (*d*). São calculadas em unidades de J / g. $\Delta G_h$ é negativa refletindo superfícies de celulose hidrofílica, enquanto $\Delta G_d$ é positiva, refletindo a oposição da matriz à expansão volumétrica necessária para dissolver a água.

**Tabela 8.** Parâmetros de sorção e dessorção obtidos pelo ajuste ao modelo de Hailwood-Horrobin.

| | Ensaio 7Pil/SAQ | | | | Ensaio 7Pil/AQ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $m_0$ | $\Delta G_d$ (J/g) | $\Delta G_h$ (J/g) | $R^2$ | $m_0$ | $\Delta G_d$ (J/g) | $\Delta G_h$ (J/g) | $R^2$ |
| **Dessorção** | 0,046 | 45,0424 | -250,123 | 0,9979 | 0,050 | 45,3505 | -253,389 | 0,9977 |
| **Sorção** | 0,039 | 41,732 | -232,579 | 0,9991 | 0,043 | 42,189 | -233,544 | 0,9991 |

Vê-se uma diferença entre o parâmetro $m_0$ para a sorção e a dessorção, essa diferença é explicada pelo fenômeno da histerese, já discutido anteriormente. A polpa proveniente do Ens. 7Pil/AQ apresenta um valor de $m_0$ ligeiramente maior que a polpa proveniente do Ens 7Pil/SAQ, indicando que esta possui maior fração amorfa ou maior volume de poros.

Tal fato deveria contribuir para a susceptibilidade à hidrólise enzimática. Entretanto, conforme resultados que serão apresentados na discussão da hidrólise enzimática das polpas, essa polpa atinge menor conversão. A limitação na conversão enzimática dessa polpa provavelmente se deve à deposição da AQ na fibra, causando um impedimento físico ao acesso das enzimas às fibras e não pelas caracteristicas da polpa.

#### 5.2.1.6 Poder Calorífico Superior

O poder calorífico é um excelente parâmetro de avaliação da potencialidade energética dos combustíveis de biomassa (BRAND, 2010). O poder calorífico de um material é expresso pelo conteúdo de energia que é liberada quando o material é queimado. Sendo assim, o calor gerado durante a combustão de diferentes espécies pode variar dependendo de suas propriedades físicas, químicas e anatômicas. Divide-se em Poder Calorífico Superior (PCS) e Poder Calorífico Inferior (PCI).

O Poder Calorífico Superior – PCS, refere-se à quantidade de calorias liberadas por um material em sua combustão completa (QUIRINO *et al.*, 2005). Quanto maior for este parâmetro, maior será a energia contida no combustível. No PCS a água formada durante o processo de combustão é condensada, recuperando o calor derivado da condensação (QUIRINO *et al.*, 2005). A quantidade de calor liberado durante a condensação do vapor de água e arrefecimento dos produtos da combustão é considerado até 25 ºC.

O Poder Calorífico Inferior - PCI é a quantidade de calor necessária para produzir um quilo de combustível, através da combustão deste com o excesso de ar e gases de descarga, resfriados até o ponto de ebulição da água, evitando sua condensação (VLASSOV, 2001).

O PCS do bagaço *in natura* e das polpas obtidas após cada condição de pré-tratamento foram determinados e são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Poder calorífico superior (PCS) para os materiais analisados neste trabalho.

| | | **PCS (MJ/kg)** |
|---|---|---|
| | **Bagaço *in natura*** | 17,3 ±0,1 |
| **Polpa** | Ensaio 5Pil/SAQ | 15,2 ±0,5 |
| | Ensaio 5Pil/AQ | 14,7 ±0,4 |
| | Ensaio 7Pil/SAQ | 15,2 ±0,3 |
| | Ensaio 7Pil/AQ | 15,0 ±0,5 |

Muitos estudos sobre o poder calorífico de diferentes biomassas e ligninas isoladas tem sido publicados (DEMIRBAS, 2001; VARGAS-MORENO *et al*., 2012; MINU *et al*., 2012). A celulose e hemicelulose tem o poder calorífico descrito entre 14,7 e 19 MJ/kg, já a lignina tem o poder calorífico descrito entre 23 e 27MJ/kg (SURINA *et al*., 2015).

Segundo Santos *et al.* (2011) o poder calorífico do bagaço de cana esta em torno de 18,5 MJ/kg e, para cada uma de suas frações reporta como 17,0 MJ/kg o poder calorífico para a celulose, 17,5 MJ/kg para a hemicelulose e 20,1 MJ/kg para a lignina.

O PCS obtido para o bagaço in natura está em acordo com o valor apresentado na literatura. Para as polpas, esse valor é menor, visto que o teor de lignina (fração do bagaço com maior poder calorífico) é reduzido nas polpas. Segundo Vale *et al.* (2011) um teor de cinzas elevado diminui o poder calorífico do material.

### 5.2.2 Fração Líquida

A fração líquida resultante do pré-tratamento alcalino é o licor negro. A lignina foi precipitada desta fração pela adição de ácido sulfúrico concentrado ao licor. Foi adicionado ácido até que o pH da mistura estivesse próximo a 2. Após essa etapa, a solução foi deixada por 12 horas para posterior filtração, usando filtro tipo prensa. A Tabela 10 apresenta as massas de lignina (estimadas por espectrofotometria UV-vis) nos licores e nas respectivas frações provenientes das lavagens das polpas celulósicas, e a massa de lignina realmente recuperada. Para completar o balanço de massas do processo de pré-tratamento, além da lignina recuperada, o filtrado dessa precipitação também foi analisado quanto aos teores de açúcares e fenólicos.

**Tabela 10.** Massas de lignina obtidas nos licores negros e águas de lavagem.

| Frações líquidas | Massa Lignina (g) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 (PilSAQ) | 5 (PilSAQ)* | 7 (PilSAQ) | 7 (PilSAQ)* | 5 (PilAQ) | 5 (PilAQ)* | 7 (PilAQ) | 7 (PilAQ)* |
| **Licor Negro** | **1269,1** | **1618,0** | **2327,7** | **1698,4** | **1224,6** | **1818,5** | **1880,2** | **1956,5** |
| **1º Lavagem** | **548,1** | **507,4** | **558,8** | **709,3** | **437,1** | **337,5** | **977,7** | **596,7** |
| **2º Lavagem** | **164,8** | **561,4** | **188,7** | **279,0** | **411,6** | **214,8** | **295,1** | **180,7** |
| **3º Lavagem** | **105,1** | **50,6** | **78,6** | **117,1** | **219,3** | **90,4** | **63,0** | **47,0** |
| 4º Lavagem | 68,6 | 17,1 | 14,8 | 35,6 | 130,5 | 51,0 | 40,0 | 23,1 |
| 5º Lavagem | 69,4 | 8,1 | 11,9 | 12,7 | 51,7 | 28,7 | 7,0 | 13,1 |
| 6° Lavagem | 29,4 | 6,4 | 6,7 | 5,4 | 17,9 | 13,2 | 5,1 | 4,6 |
| Massa teórica pelo teor de lignina na biomassa (g) | 2700 | 2700 | 2700 | 2700 | 2700 | 2700 | 2700 | 2700 |
| Massa teórica de lignina pela concentração nas frações líquidas** (g) | 2087,2 | 2737,5 | 3153,9 | 2803,9 | 2292,6 | 2461,2 | 3216,0 | 2780,9 |
| Massa recuperada da fração líquida **(g) | 1499,1 | 1735,9 | 1219,7 | 1888,9 | 1077,1 | 1015,0 | 1713,6 | 1736,4 |
| Rendimento de recuperação em relação a massa de lignina na biomassa (%) | 55,5 | 64,3 | 45,2 | 70,0 | 39,9 | 37,6 | 63,5 | 64,3 |

*duplicata, ** a massa de lignina referente à precipitação do licor negro e três primeiras lavagens.

Para a precipitação da lignina, em todos os ensaios, utilizaram-se as quatro primeiras frações: Licor negro, 1°, 2° e 3° lavagem, devido ao fato de que a partir da 4° lavagem a massa de lignina presente no licor é substancialmente reduzida, não justificando o gasto de reagente (ácido sulfúrico) para essa recuperação.

É possível observar a partir da Tabela 10 que foi possível recuperar uma menor massa de lignina nos ensaios 5 e 7 Pil SAQ em relação as suas duplicatas. Na primeira reação a lignina foi filtrada logo após o processo de precipitação, sem o período de descanso por volta de 12 horas conforme realizado para as posteriores reações (duplicatas), resultando na formação de uma emulsão, conforme a Figura 31. Supõe-se que o tempo de descanso da lignina altera na filtrabilidade desta, resultando em significativas perdas de massa durante o processo de filtragem.

**Figura 31.** Imagens do licor negro precipitado do ensaio 5 (PilSAQ) e do licor negro emulsionado da duplicata 5 (PilSAQ).

Fonte: Próprio autor.

Estudos de estabilidade de uma solução de lignina oxidada em meio alcalino efetuado com raios-X de baixo ângulo (SAXS) por Maziero e colaboradores (2012) mostrou que a lignina sofre alterações com o tempo, levando em torno de 5 dias para estabilizar a sua estrutura.

Como a lignina sofre modificações substanciais de acordo com o pré-tratamento que foi utilizado para sua extração, certamente a lignina proveniente do processo soda também sofre alterações de conformação com o tempo, resultando assim em diferentes

rendimentos de recuperação de acordo com o tempo de descanso do material prévio a precipitação.

Para uma melhor análise do efeito do tempo em relação à conformação da lignina e rendimento de precipitação seriam necessários ensaios para a lignina obtida nessas condições.

Além desse ponto, nota-se que as massas teóricas de lignina obtidas de acordo com a medição de UV-vis em 280nm para a quantificação do teor de lignina das frações recolhidas, apresentaram-se para alguns ensaios com um valor superior ao valor teórico de lignina obtida pelo teor da caracterização do material inicial. A técnica analítica de espectrofotometria do UV-vis quantifica no comprimento de onda selecionado qualquer substância que possua uma absorção de radiação nessa região. Além da lignina, outras substâncias aromáticas formadas e ou liberadas (extrativos) durante o processo de pré-tratamento podem absorver na mesma região (280nm), superestimando assim a real concentração de lignina solúvel na fração liquida recolhida.

#### 5.2.2.1 Análise Química

As ligninas foram caracterizadas por análise gravimétrica, quanto à porcentagem solúvel e insolúvel em acido sulfúrico 72%, e quanto ao teor de carboidratos, para compor o balanço de massas do processo e os resultados são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Caracterização das ligninas obtidas nos ensaios estudados.

| (%) | 5Pil/$S_{AQ}$ | 5Pil/AQ | 7Pil/$S_{AQ}$ | 7Pil/AQ |
|---|---|---|---|---|
| Carboidratos | 16,6 | 10,6 | 17,8 | 13,2 |
| Lignina Solúvel | 6,4 | 5,2 | 6,9 | 5,1 |
| Lignina Insolúvel | 73,6 | 81,5 | 72,8 | 79,4 |
| Lignina Total | 80,0 | 86,7 | 79,8 | 84,5 |
| Cinzas | 1,8 | 1,2 | 0,9 | 0,7 |

Devido à natureza das técnicas de pré-tratamento e precipitação, uma quantidade significativa de açúcares e cinzas podem estar presentes se a amostra não for copiosamente

lavada. Estas ligninas apresentam um elevado teor açúcares provenientes da hemicelulose, variando entre 10 e 18%. A lignina e a hemicelulose são ligadas através de uma ponte fenólica. Os ácidos ferúlico e p-cumárico estão esterificados à hemicelulose e lignina, respectivamente, explicando a remoção de fragmentos de hemicelulose durante o pré-tratamento e subsequente precipitação destes fragmentos junto à lignina (CRESTINI; ARGYROPOULOS, 1997).

#### 5.2.2.2 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Analisou-se uma amostra de lignina precipitada a partir de cada reação feita em escala ampliada. A Figura 32 mostra o espectro de infravermelho para as ligninas, com ampliações nas regiões dicutidas, comparando as ligninas resultantes das diferentes condições de pré-tratamento.

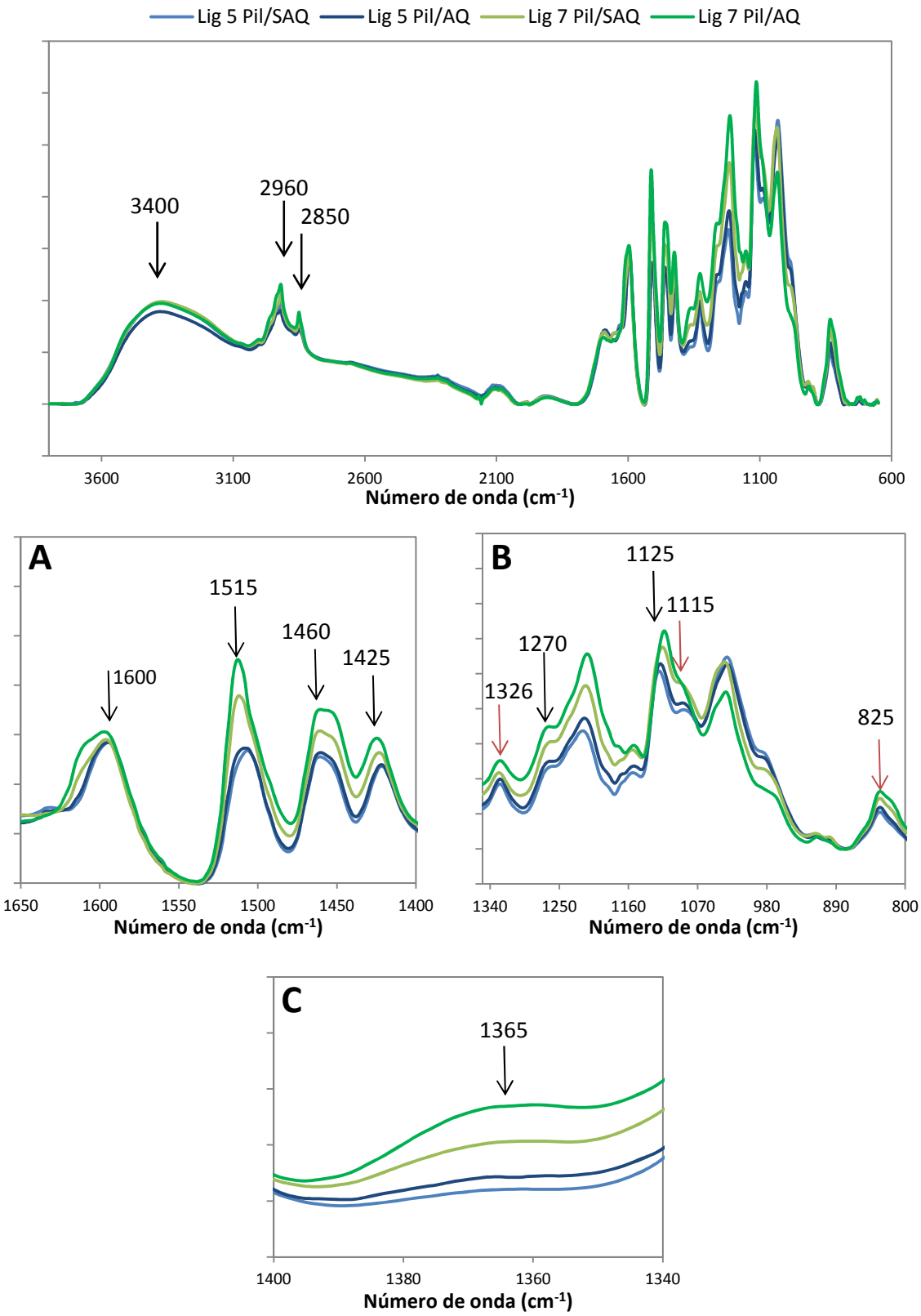
Todas as amostras apresentam picos nas regiões correspondentes às vibrações de alongamento do anel aromático, em 1600, 1515 e 1425 $cm^{-1}$ (Figura 32-A). Possuem um pico largo em 3400 $cm^{-1}$ que está associado a vibrações de grupos OH aromáticos e alifáticos. Em 2960, 2925, 2850 e 1460 $cm^{-1}$ vibram as ligações C-H de grupos $CH_2$ e $CH_3$ (Figura 32 e Figura 32-A).

Os métodos de deslignificação usados na obtenção da lignina assim como o material de partida de onde é extraída a lignina afetam sua estrutura final. Tejado *et al.* (2007) mostraram um espectro de lignina de pinus obtida por polpação Kraft em que a clivagem das ligações β-O-4 e α-O-4 gera grande quantidade de grupos OH fenólicos não esterificados, visíveis no espectro em 1365 $cm^{-1}$. Já uma lignina de linho (dicotiledônea), obtida por polpação soda, com a quebra dessas ligações aril-eter, formam apenas poucas unidades de OH fenólicos (menor pico em 1365 $cm^{-1}$), pois possuem maior quantidade de grupos S na sua lignina, não possuindo tantas ligações do tipo β-O-4 e α-O-4 (como as ligninas de pinus) a serem clivadas. Dentre as ligninas aqui analisadas, é possível observar o pico em 1365 $cm^{-1}$ com maior intensidade para as ligninas obtidas em maior temperatura (170°C), mostrando que na temperatura mais elevada, ocorre maior quebra dessas ligações aril-eter (Figura 32-C).

A lignina de bagaço apresenta em sua estrutura unidades do tipo G, S e H, sendo vistos picos tanto em 825, 1115 e 1326 $cm^{-1}$, que correspondem a vibrações de estrutura tipo S, quanto em 1270 e 1125 $cm^{-1}$ (Figura 32-C), que correspondem a vibrações de

estrutura do tipo G. Apresenta banda em 1030 $cm^{-1}$, correspondendo a grupos OH alifáticos e em 1680 $cm^{-1}$, para carbonilas conjugadas.

**Figura 32.** Espectro FTIR das ligninas obtidas em escala piloto nas diferentes condições.




Fonte: Próprio autor.

A lignina é a única matéria-prima renovável disponível em grande volume, composta por aromáticos (TUCK *et al.*, 2012) e pode ser usada tanto como mistura em compósitos poliméricos verdes ou convertida a combustíveis líquidos, hidrogênio e outros (THAKUR *et al.*, 2014; AZADI *et al.*, 2013).

Para a conversão em produtos químicos (tais como p-xileno, resinas, fibras de carbono, solventes e adesivos) é necessário uma lignina com quantidade reduzida de impurezas como carboidratos e cinzas (SINGH *et al.*, 2005). A utilização da lignina para obtenção de produtos de alto valor será altamente dependente de suas propriedades, tais como o índice de polidispersidade, pureza, viscoelasticidade e a disponibilidade de diferentes grupos funcionais (GELLERSTEDT *et al.*, 2010; GLASSER *et al.*, 1983).

Diversas são as propostas na literatura para aplicações de lignina. Por isso, o conhecimento das características da lignina gerada no processo é importante para ajudar a definir qual a melhor aplicação para estas ou, qual modificação pode ser feita para aumentar seu potencial para determinada aplicação.

#### 5.2.2.3 Análise elementar e Fórmula mínima

A lignina é uma macromolécula de constituição difícil de ser estabelecida, por causa não somente da complexidade de sua formação, baseada em unidades fenilpropanóides interligadas por diferentes tipos de ligações, como também porque sofre modificações estruturais durante seu isolamento da parede celular (MORAIS, 1987, 1992).

Com base nos resultados da análise elementar das amostras de lignina listados na Tabela 12, foi proposta uma possível composição empírica (fórmula mínima C9) para as ligninas estudadas, calculadas de acordo com Saliba *et al.* (2001) usando dados da análise de RMN de $^{1}H$.

**Tabela 12.** Análise elementar, teor de metoxila e fórmula mínima (C9).

| | %C | %H | %O | $OCH_3$ | Fórmula mínima |
|---|---|---|---|---|---|
| **Ens 5Pil/SAQ** | 55,7 | 6,85 | 36,6 | 1,6 | $C_{9,0}\ H_{10,7}\ O_{3,6}\ (OCH_3)_{1,60}$ |
| **Ens 5Pil/AQ** | 57,2 | 6,51 | 35,3 | 1,55 | $C_{9,0}\ H_{9,6}\ O_{3,3}\ (OCH_3)_{1,55}$ |
| **Ens 7Pil/SAQ** | 59,4 | 6,92 | 33 | 1,42 | $C_{9,0}\ H_{10,2}\ O_{2,9}\ (OCH_3)_{1,42}$ |
| **Ens 7Pil/AQ** | 63,2 | 6,66 | 29,34 | 1,25 | $C_{9,0}\ H_{9,1}\ O_{2,3}\ (OCH_3)_{1,25}$ |

As análises de RMN de $^{1}H$ das ligninas foram realizadas pela equipe do laboratório de RMN do Laboratório Nacional de Biociências – LNBio e os espectros com a definição e integração dos picos são apresentados no Apêndice D.

Devido ao fato da lignina apresentar três precursores e não se conhecer a proporção de cada um na macromolécula de lignina do bagaço, o teor de carbono pode variar entre 57,9, 60,9 e 63,2%, que correspondem aos teores de carbono do álcool sinapílico (unidade siringila), álcool coniferílico (unidade guaiacila) e álcool cumarílico (unidade p-hidroxifenila), respectivamente, acrescidos de uma molécula de água (MARABEZI, 2009). O teor de carbono abaixo do valor reportado na literatura para a lignina proveniente do Ens 5Pil/SAQ, se justifica pelo alto teor de impurezas nessa lignina, como o teor de cinzas (o maior teor entre as ligninas analisadas) e o teor de carboidratos, maior que 10%.

Pelos resultados da análise de RMN de $^{1}H$, as ligninas apresentaram um teor elevado de metoxilas, incluindo valores acima de 1,5, sendo que, para lignina de gramíneas, que são do tipo HGS, a literatura reporta que esse valor esteja perto de 1 (o valor máximo possível na formula C9 para metoxilas seria igual a 2, correspondendo a unidade siringila, com 2 metoxilas).

A metodologia de RMN não é a ideal para determinação de metoxilas. Outros métodos devem ser utilizados para sua determinação e com eles, ser feita a correção dos resultados de RMN para a estimativa da fórmula mínima. A pirólise analítica seguida por cromatografia gososa e espectrometria de massas é uma análise bem mais sensível que o RMN e, não dependente da acetilação e dissolução da lignina para sua realização, sendo mais indicada para o cálculo do teor de metoxilas.

As ligninas obtidas neste trabalho também foram analisadas por duas outras técnicas, o RMN bidimensional e a Pirólise seguida por cromatografia gososa e espectrometria de massas, pelo Instituto de Recursos Naturais e Agrobiologia de Seville, na Espanha. Os resultados dessas análises ainda serão publicados e apontam que as ligninas obtidas após cada pré-tratamento apresentam características diferentes, sendo reduzidas em unidades S quanto maior a severidade do pré-tratamento para sua obtenção, além de sofrem pouca oxidação estrutural.

A Tabela 13 apresenta os teores de metoxila calculados com base nos resultados obtidos por essas outras técnicas.

**Tabela 13.** Teor de metoxilas determinado por RMN-2D e Pirólise analítica.

| | **Por RMN-2D** | **Por Pyr-CG/MS** |
|---|---|---|
| | ($OCH_3$) por C9 | (OCH3) por C9 |
| **5/SAQ** | 1,64 | 1,38 |
| **5/AQ** | 1,57 | 1,35 |
| **7/SAQ** | 1,17 | 1,07 |
| **7/AQ** | 1,12 | 1,01 |

Os resultados de teor de metoxila calculados pelos resultados de RMN-2D são bem próximos aos obtidos pela análise de RMN de $^1H$, principalmente para as ligninas 5/SAQ e 5/AQ, que tem maior teor de metoxilas (Tabela 12 e Tabela 13). Utilizando os dados de pirólise, encontram-se valores menores para o teor de metoxilas, mais coerentes para ligninas do tipo HGS (Tabela 13). Estes teores corroboram com os resultados anteriores, de que ocorre uma remoção preferencial de unidades S durante a deslignificação alcalina quanto maior a severidade do processo. Fazendo a correção do teor de metoxila, pôde-se recalcular a fórmula mínima para cada lignina obtida. As novas fórrmulas, com valores mais coerentes para o teor de metoxilas, são apresentadas na Tabela 14.

**Tabela 14.** Teor de metoxilas por unidade C9 determinada pelos resultados de Pyr-CG/MS e fórmula mínima corrigida.

| | **($OCH_3$) por C9** | **Fórmula mínima** |
|---|---|---|
| **Ens 5Pil/SAQ** | 1,38 | $C_{9,0}\ H_{11,0}\ O_{3,7}\ (OCH_3)_{1,38}$ |
| **Ens 5Pil/AQ** | 1,35 | $C_{9,0}\ H_{10,0}\ O_{3,5}\ (OCH_3)_{1,35}$ |
| **Ens 7Pil/SAQ** | 1,07 | $C_{9,0}\ H_{10,8}\ O_{3,1}\ (OCH_3)_{1,07}$ |
| **Ens 7Pil/AQ** | 1,01 | $C_{9,0}\ H_{9,5}\ O_{2,5}\ (OCH_3)_{1,01}$ |

#### 5.2.2.4 Poder calorífico superior

O poder calorífico superior também foi determinado para cada uma das ligninas obtidas e os valores são apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Poder calorífico superior (PCS) para as ligninas obtidas.

| | | PCS (MJ/kg) |
|---|---|---|
| | **Bagaço *in natura*** | 17,3 ±0,1 |
| **Lignina** | Ensaio 5Pil/SAQ | 22,8 ± 0,1 |
| | Ensaio 5Pil/AQ | 23,3 ± 0,6 |
| | Ensaio 7Pil/SAQ | 24,2 ± 0,5 |
| | Ensaio 7Pil/AQ | 25,3 ± 1,1 |

As ligninas obtidas apresentam poder calorífico entre 22,8 e 25,3 MJ/kg, sendo crescente o poder calorífico quanto maior a severidade do processo de obtenção de cada lignina. Na literatura a lignina tem o poder calorífico descrito entre 23 e 27MJ/kg (SURINA *et al*., 2015).

O poder calorífico para o resíduo da hidrólise enzimatica também foi determinado, com valor de 16 MJ/kg. O poder calorífico do resíduo da hidrólise é proximo ao valor do bagaço in natura, devido a sua composição (50% celulose, 18% hemicelulose e 22% lignina).

### 5.2.3 Balanço de Massa

A aplicação da lei da conservação para analisar um processo contabilizando a massa de cada reagente/produto entrando ou saindo de uma unidade do processo é extremamente importante para o projeto e a otimização de processos de bioconversão e biorrefinaria (BURKHART, 2010; GARLOCK *et al.*, 2011). Além disso, a comparação efetiva de diferentes pré-tratamentos, rastreando o destino da celulose e da hemicelulose em todo o processo gera informações mais precisas (GARLOCK *et al.*, 2011).

Análogo a uma refinaria de petróleo, as futuras biorrefinarias, sem dúvida, exigirão que todas as frações do material de partida sejam usadas e quantificadas com precisão. No entanto, para garantir um balanço de massas confiável, é extremamente importante aplicar métodos analíticos robustos para quantificar cada componente da biomassa na entrada e saída do sistema. (BURKHART, 2010; BURKHART *et al.*2013).

De acordo com a Tabela 16, 5,13 kg de celulose entram no sistema de pré-tratamento e saem em percentagens diferentes nas correntes de processo de acordo com as condições de reação. A maior parte do teor de celulose foi recuperada na polpa, com uma média de 81%. É possível observar na Figura 33, que as reações realizadas com adição de AQ resultaram em maior preservação de celulose durante o pré-tratamento alcalino em relação às realizadas sem a antraquinona. A segunda corrente com mais carboidratos quantificados provenientes da celulose foi a corrente de lavagem, com uma média de 20%. A lignina sólida, recuperada pela precipitação ácida do licor negro, apresentou uma baixa contribuição no teor de celulose de 0,1-1,6%.

A hemicelulose, assim como a celulose, foi recuperada principalmente na polpa, com maior preservação desta fração para as condições realizadas com adição de AQ.

Na fração de lignina sólida recuperada foi quantificado um teor variável de 3,3-8,0% de carboidratos provenientes da hemicelulose em relação ao total presente no bagaço. A hemicelulose apresentou o menor balanço de massas dos componentes, com 9-19% de perda de massa durante o processo. Considerando-se os carboidratos da fração hemicelulósica, ou seja, a arabinose e a xilose, a fração xilose foi a responsável pela percentagem de perda de hemicelulose, de acordo com a Figura 34. Esta fração pode ser degradada a ácidos carboxílicos que não são detectados pela metodologia de quantificação utilizada. De acordo com *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (2005) a xilose e arabinose tem ponto de fusão de 90,5°C e 164,5°C, respectivamente. Sendo a arabinose mais estável que a xilose, este pode ser um dos fatores que contribuem para maior recuperação em massa da arabinose em relação à xilose. Acima de 90,5°C a xilose pode degradar e condensar com fragmentos fenólicos enquanto a arabinose, a essa temperatura, apenas começa a fundir. A literatura indica que essas perdas no teor de xilose são principalmente causadas pela formação de substâncias poliméricas húmicas, que resultam da degradação de furfural (HATZIS *et al*., 1996).

Gleason & Barker (1970), em estudos de oxidação de pentoses em solução alcalina descreve a redução da reatividade das pentoses na sequência: D-xilose (2,0), D-ribose (1,4) e L-arabinose (1,2). Rocha *et al*. (2012a) relata 13,1% e 12,6% de perda de pentoses durante o pré-tratamento e deslignificação, respectivamente, que foram atribuídas a degradação por razões físicas durante a filtração e lavagem.

Para as reações 5Pil e 7Pil, respectivamente, o teor de ácido acético na fração líquida foi quase 20% e 42% maior que o teor deste na biomassa inicial. De acordo com Palmqvist e Hahn-Hagerdal (2000) o ácido acético pode ser produzido durante a

degradação da hemicelulose e da lignina e o seu conteúdo em hidrolisados aumenta com o aumento da temperatura e concentração de produtos químicos, de modo que o excesso de grupo acetil quantificado na corrente de lavagem pode ser também proveniente da degradação da lignina.

O ácido acético é um dos principais inibidores da etapa subsequente de fermentação. Em pré-tratamentos ácidos ou de auto-hidrólise, a fração solubilizada é a fração hemicelulósica. Nesses pré-tratamentos, a xilose é solubilizada junto ao ácido acético, sendo necessária uma etapa de detoxificação para fermentação desses açúcares. Diferentemente destes, os pré-tratamentos alcalinos, solubilizam em maior proporção a fração lignina e, como mostrado pelo balanço de massas, os acetatos da fração hemicelulósica também são solubilizados, evitando a necessidade de detoxificação do licor de hidrólise da polpa obtida por pré-tratamento alcalino.

Os fragmentos de lignina que não foram precipitados e seguiram na corrente de lavagem representam de 14- 19,8% do teor de lignina inicial no bagaço (Figura 34). As polpas resultantes dos pré-tratamentos possuem entre 12,5 - 26% do teor de lignina inicial do bagaço, que não foram removidos durante o pré-tratamento alcalino.

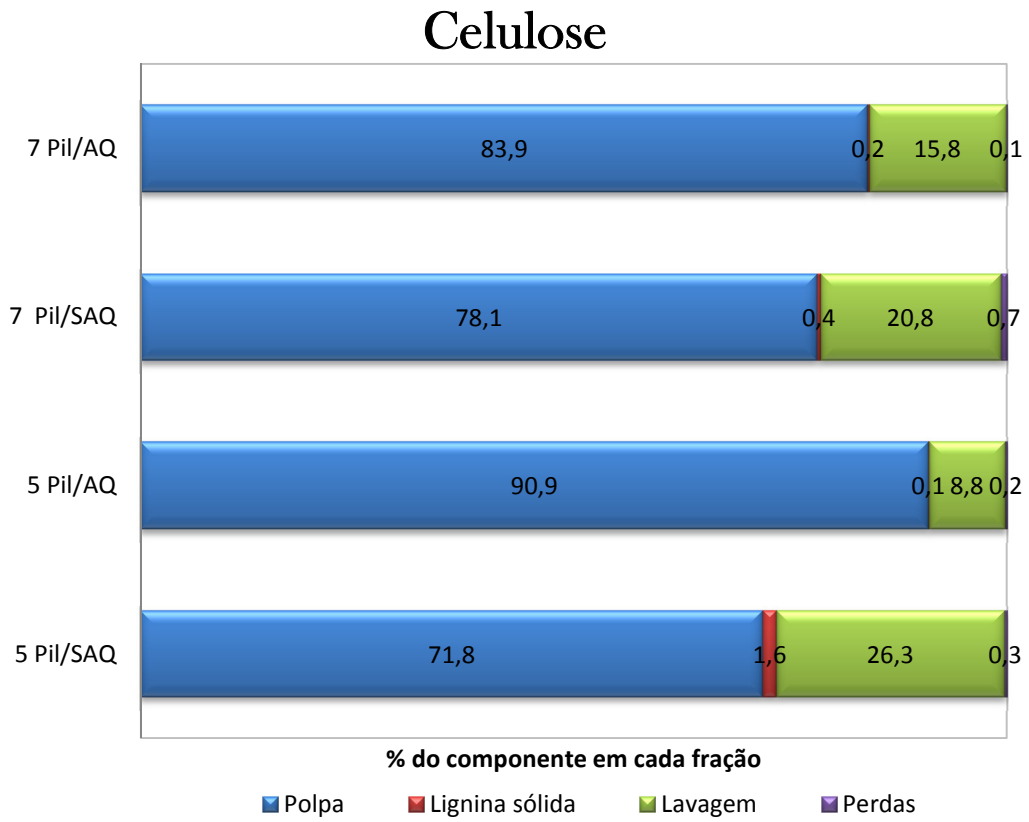
A lignina apresentou um balanço de massas com 9,7- 25,7% de perda durante o processo. Entretanto, para obter a fração de lignina sólida, o licor negro concentrado foi precipitado com ácido sulfúrico e filtrado e, para remover o sulfato residual da lignina e ajustar o pH, o sólido precipitado foi lavado exaustivamente com água. Apenas uma fração do volume da água de lavagem foi utilizado para a quantificação de lignina solúvel e carboidratos e, ao longo do processo de lavagem, o pH foi aumentado progressivamente (pH~ 2- pH ~6). Sabe-se que a solubilidade de uma macromolécula diminui com o aumento do peso molecular (FLORY, 1953), de modo a lignina com um peso molecular elevado tem um valor de pKa aparente mais elevado que a lignina de baixo peso molecular. Assim, as moléculas menores de lignina, que têm uma maior solubilidade, solubilizam com mais facilidade conforme o pH se torna mais neutro durante o passo de lavagem (NORGREN *et al*., 2001).

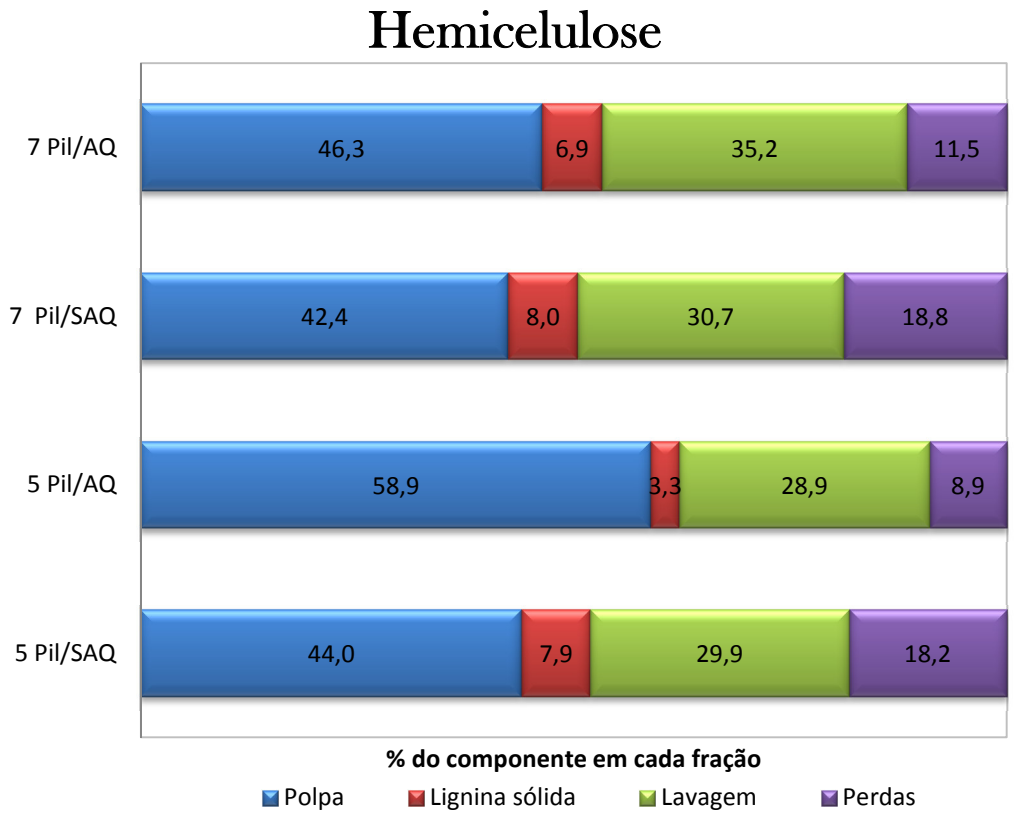
Rocha *et al*. (2012) relataram que 13,8% da lignina contida no bagaço inicial foi perdido, e a maior parte das perdas (10,6%) ocorreu nas fases de deslignificação e precipitação.

**Tabela 16**. Balanço de massas considerenado os principais carboidratos e lignina dos pré-tratamentos realizados em escala piloto.

| | Entarada | Saída | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Componentes (kg) | Bagaço *in natura* | 5Pil SAQ | 5Pil AQ | 7Pil SAQ | 7Pil AQ |
| Celulose | 5,13 | 5,12 | 5,12 | 5,10 | 5,13 |
| Hemicelulose | 3,16 | 2,58 | 2,88 | 2,56 | 2,79 |
| *Xilose* | 3,09 | 2,30 | 2,51 | 2,25 | 2,53 |
| *Arabinose* | 0,27 | 0,27 | 0,26 | 0,27 | 0,27 |
| *Grupo Acetil* | 0,25 | 0,32 | 0,30 | 0,37 | 0,36 |
| Lignina | 2,71 | 2,45 | 2,01 | 2,22 | 2,29 |
| Cinzas | 0,52 | 0,52 | 0,50 | 0,52 | 0,52 |
| Extrativos | 0,6 | NA | NA | NA | NA |
| Total | 12,1 | 10,67 | 10,64 | 10,40 | 10,92 |
| Balanço de Massas (%) | | 87,7 | 86,5 | 85,6 | 88,2 |

**Figura 33.** Porcentagem em massa da distribuição de cellulose, hemicellulose, arabinose e xilose nas correntes de saída (Polpa, Lignina sólida e Lavagem) de acordo com cada condição de reação.

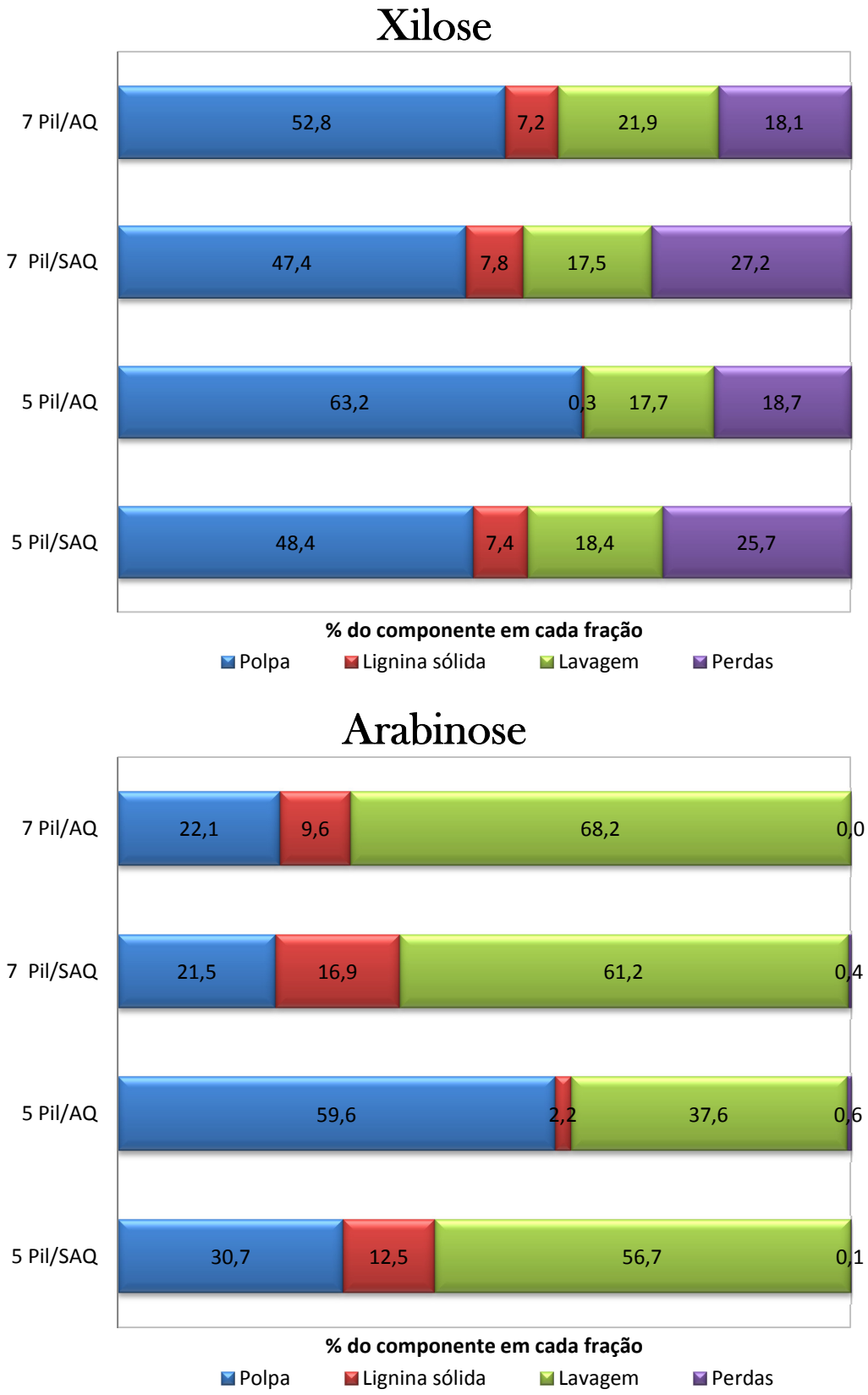



(Continua)

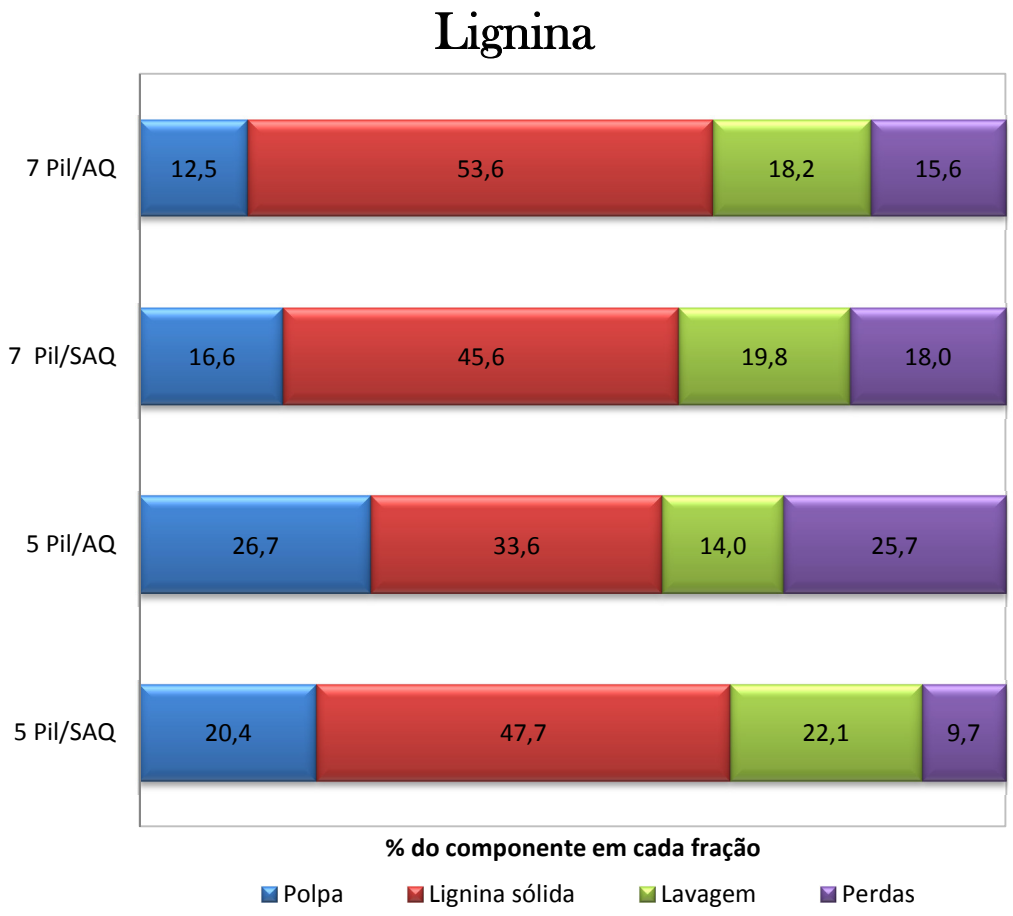
(Conclusão)

**Figura 33.** Porcentagem em massa da distribuição de cellulose, hemicellulose, arabinose e xilose nas correntes de saída (Polpa, Lignina sólida e Lavagem) de acordo com cada condição de reação.




Fonte: Próprio autor.

**Figura 34.** Balanço de Massa da lignina (porcentagem) na polpa, lignina sólida, corrente de lavagem e perdas durante o pré-tratamento alcalino em escala piloto do bagaço de cana.




Fonte: Próprio autor.

O balanço de massa para as reações em escala piloto, a 130°C e 170°C, com e sem adição de antraquinona fecha com média de 87%. Considerando que foi relatado o balanço para um processo de múltiplos passos, que envolve o pré-tratamento, a separação sólido/líquido, a precipitação de lignina, e a recuperação e filtração da lignina, com as perdas de massa e volume associados, o fechamento do balanço obtido pode ser considerado satisfatório.

O balanço de massas para os materiais lignocelulósicos é ainda um desafio, devido ao fato de que apresenta uma complexidade adicional para os métodos de análise, com diferentes graus de reação dos componentes da biomassa, incluindo; a despolimerização da lignina, formação de pseudo-lignina e a formação de açúcares monoméricos que são mais susceptíveis a degradação em relação aos polissacarídeos (BURKHARDT *et al.*, 2013).

Outro fator importante, que deve ser considerado no balanço de massas é o conteúdo de extrativos, uma categoria vasta de compostos, que varia desde gorduras e ceras hidrofóbicas a polifenóis moderadamente solúveis em água e compostos altamente polares, tais como os açúcares. Os extrativos são quantificados na matéria-prima, utilizando uma combinação de solventes, no entanto, a quantificação seletiva destes grupo de componentes após o pré-tratamento do material não é convencional, conduzindo a imprecisões no balanço de material (HAMES, 2010; FENGEL; WEGNER, 1989; BURKHARDT *et al.*, 2013). Assim, os métodos de análise utilizados devem ser refinados para serem capazes de quantificar os produtos de degradação de carboidratos e de lignina, e extrativos, presentes nos materiais in natura e nas correntes sólidas e líquidas geradas após os processamentos.

## 5.2. Hidrólise Enzimática

Após a obtenção das polpas foram realizados ensaios em *shaker* para determinação da conversão enzimática. As reações de hidrólise enzimática foram realizadas em duplicatas, para cada uma das oito polpas obtidas, e o valor médio da média das duplicatas para duas polpas obtidas na mesma condição foi considerado como a porcentagem de conversão.

A Tabela 17 a seguir mostra as porcentagens de conversão, de celulose à glicose e de xilana à xilose, e os respectivos teores de cada fração no material. A conversão da xilana foi calculada considerando apenas a xilose liberada em comparação ao teor de xilana presente na polpa, não considerando o teor de hemicelulose total, que inclui arabinose e ácido acético.

O complexo enzimático utilizado para a hidrólise, a Celluclast 1.5 L contém predominantemente celulases do tipo endo glucanases, não sendo específico para a quebra da hemicelulose. Apesar de não ser específica, a Celluclast 1.5 L também possui atividade xilulolítica, reportada por Khan (2010) em sua dissertação. No presente trabalho foi possível observar a conversão de parte da xilana utilizando a enzima Celluclast. Porém, uma otimização também da hidrólise da fração hemicelulósica é importante, visto que pode ser feito um melhor aproveitamento do material se mais frações forem utilizadas na produção de etanol.

**Tabela 17.** Teor de celulose e xilana e porcentagem de conversão ao respectivo monômero para cada uma das polpas estudadas.

| | Celulose (%) | Conversão à Glicose (%) | Xilana (%) | Conversão à Xilose (%) |
|---|---|---|---|---|
| Ens.5Pil/ $S_{AQ}$ | 58,6 | 71,0 ± 1,4 | 21,0 | 60,0 ± 2,8 |
| Ens.5Pil/AQ | 60,5 | 68,2 ± 0,3 | 22,3 | 62,4 ± 3,0 |
| Ens.7Pil/ $S_{AQ}$ | 63,1 | 70,7 ± 1,0 | 20,3 | 62,8 ± 0,5 |
| Ens.7Pil/ AQ | 67,0 | 55,1 ± 1,4 | 22,4 | 54,8 ± 1,1 |

Como é possível observar na Tabela 17, as polpas obtidas nos ensaios 5 e 7, sem a adição de antraquinona, atingiram uma conversão de aproximadamente 70% em glicose e 60% em xilose, independente da temperatura em que foram obtidas. Quando se compara o ensaio 7 feito com e sem a adição de antraquinona, nota-se o efeito negativo na conversão enzimática quando a antraquinona é adicionada ao processo. Esse efeito negativo também foi observado para essa condição quando testada em escala laboratorial, reduzindo em mais de 20% a conversão final da polpa em açúcares fermentescíveis.

Para as polpas obtidas pelo Ensaio 5, esse efeito negativo na conversão enzimática causado pela adição de antraquinona no processo é menos marcante. Supõe-se então que a difusão e deposição da antraquinona sob as fibras celulósicas esta relacionada com a temperatura de cozimento. A polpa obtida pelo ensaio 5/AQ alcançou 68% de conversão em glicose e 62% de conversão em xilose, sendo similar à conversão alcançada para a polpa obtida em laboratório nessas condições.

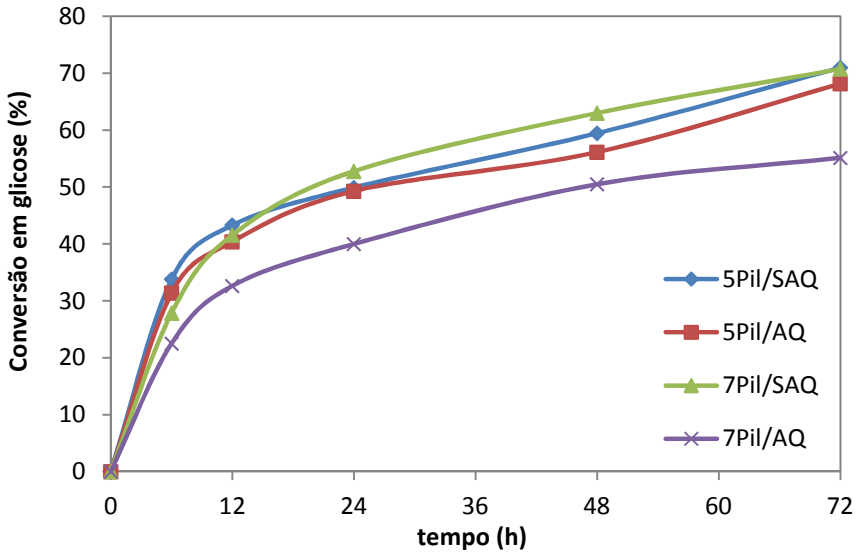
Supõe-se que a deposição de antraquinona na fibra seja um impedimento a mais na acessibilidade da enzima, ocasionando a diminuição na taxa de conversão. A ação da antraquinona se dá por um sistema redox. A antraquinona é insolúvel em meio aquoso, mas sua forma reduzida, a antrahidroquinona, é solúvel no licor, o que permite sua difusão. Quando esta é reoxidada, sua forma oxidada insolúvel pode ficar depositada na fibra, tornando-se uma barreira à enzima.

A lignina remanescente na polpa 7Pil/AQ, mesmo em menor quantidade, possivelmente tem características diferentes da lignina remanescente na polpa 5Pil/AQ causando maior bloqueio e interferência na hidrólise enzimática. A lignina na sua forma sólida bloqueia o acesso à celulose, enquanto que na forma solúvel pode causar a adsorção

da enzima. Em qualquer forma, é um agente que impede as enzimas de alcançarem sua meta. (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; ZHU, 2005).

A Figura 35 apresenta a conversão em glicose da celulose presente em cada material pelo tempo de hidrólise.

**Figura 35.** Conversão enzimática de celulose a glicose por tempo de reação para as diferentes polpas estudadas.




Fonte: Próprio autor.

O gráfico da conversão pelo tempo de reação mostra que a velocidade de conversão é maior no inicio da reação e diminui com o tempo. Aproximadamente 40% da conversão ocorrem nas primeiras seis horas de reação. Inicialmente, ocorre principalmente a degradação da região amorfa pelas endoglucanases expondo maior quantidade de extremidades de cadeia de celulose, permitindo maior acesso das celobiohidrolases (EIBINGER *et al.*, 2014). Com o passar do tempo, o material remanescente tem caráter mais cristalino, além disso, as enzimas podem sofrer inibição pelo produto, tornando a conversão mais lenta.

Assumindo que a relação entre a conversão de celulose e o tempo de hidrólise pode ser descrita similar à isoterma de Langmuir, como descreveu Kun *et al.* (2013) têm-se a equação a seguir para a cinética de conversão da celulose:

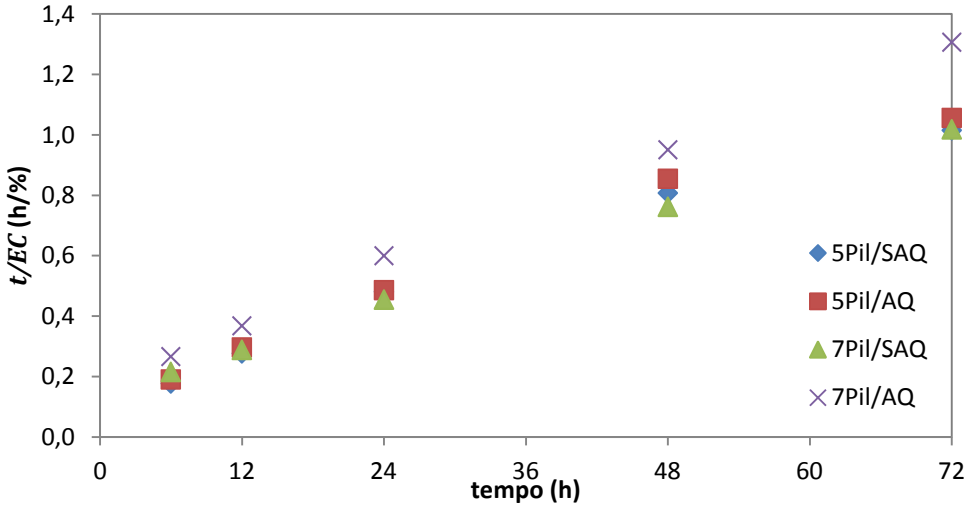
$$CE = \frac{abt}{(1 + bt)}$$

Que também pode ser expressa como:

$$\frac{t}{CE} = \frac{1}{ab} + \frac{t}{a}$$

Em que, CE é a conversão enzimática, "a" é capacidade da celulose em hidrolisar, "b" é uma constante, e "t" é o tempo de hidrólise. A relação entre t /CE e t é mostrada na Figura 36 e os resultados de regressão são apresentados na Tabela 18.

**Figura 36.** Correlação linear expressa pela isoterma de Langmuir [t/EC=1/ab+t/a].




Fonte: Próprio autor.

**Tabela 18.** Parâmetros cinéticos da correlação linear para a hidrólise enzimática.

| Amostra | Ajuste Linear | r² | *a* | *b* (x10²) |
|---|---|---|---|---|
| **Ens. 5Pil/SAQ** | y = 0,0134 X + 0,1214 | 0,9519 | **74,6** | 11,04 |
| **Ens. 5Pil/AQ** | y = 0,0139 X + 0,1389 | 0,9435 | **71,9** | 10,01 |
| **Ens. 7Pil/SAQ** | y = 0,0131 X + 0,1403 | 0,949 | **76,3** | 9,34 |
| **Ens. 7Pil/AQ** | y = 0,0171 X + 0,1292 | 0,9751 | **58,5** | 13,24 |

O parâmetro "*a*", que é descrito como a capacidade da celulose em hidrolisar corrobora com os resultados já discutidos de que a deslignificação aumenta a susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática e que, quando a deslignificação ocorre a uma maior temperatura (sob condições mais severas), esse efeito é aumentado, como pode

ser observado comparando-se o parâmetro "*a*" para a polpa do Ens. 5Pil/SAQ com a do Ens. 7Pil/SAQ (74,6 e 76,3, respectivamente).

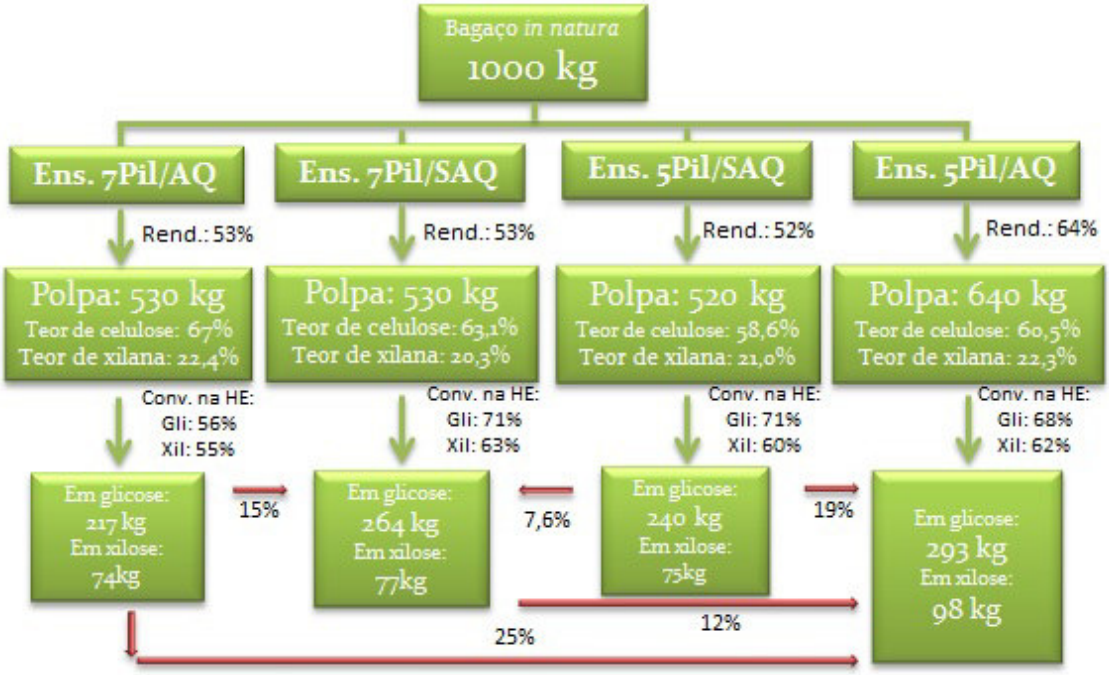
Entretanto, a antraquinona influencia negativamente na conversão enzimática da celulose, o que sugere que sua deposição dentro das fibras pode ser um dos fatores que diminuem a acessibilidade da celulose às enzimas, como já discutido anteriormente. Esse efeito negativo pode ser visto comparando-se o parâmetro "*a*" para a polpa do Ens. 5Pil sem (/SAQ) e com (/AQ) adição de antraquinona (74,6 e 71,9, respectivamente), sendo ainda mais evidenciado quando o processo de deslignificação é realizado a temperaturas mais elevadas. Compare o parâmetro "*a*" para a polpa do Ens. 7Pil sem (/SAQ) e com (/AQ) adição de antraquinona (76,3 e 58,5, respectivamente)

Essa correlação, analisando a cinética de hidrólise com a isoterma de Langmuir já foi discutida em artigo publicado pelo grupo (ROCHA *et al*., 2015 b) para polpas de bagaço provenientes de outros tipos de pré-tratamento. Comparando os resultados, os pré-tratamentos alcalinos, independente da temperatura, permitem uma susceptibilidade de hidrólise da celulose, representada pelo parâmetro "*a*", similar ao alcançado após um pré-tratamento de explosão a vapor do bagaço de cana ("*a*" = 76,4).

Após a análise da conversão enzimática, tem-se que a polpa obtida pelo ensaio 7/AQ não é vantajosa para a obtenção de açúcares para fermentação. Considerando rendimento mássico de pré-tratamento e a conversão enzimática, elege-se a condição do ensaio 5Pil/AQ como a mais vantajosa, sendo a condição que apresenta o maior rendimento em açúcares.

A Figura 37 a seguir mostra um fluxograma para o rendimento em glicose partindo de 1000 kg de bagaço "in natura", extrapolando os resultados obtidos para cada condição de pré-tratamento realizado.

**Figura 37.** Rendimento em glicose partindo de 1000 kg de bagaço, para cada condição experimentada em escala piloto.




Fonte: Próprio autor.

O rendimento em glicose considerando o rendimento da reação, o teor de celulose na polpa obtida e a conversão enzimática para cada uma das condições experimentadas em escala piloto, é maior para a condição do ensaio 5Pil/AQ em 12% em relação ao 7Pil/$S_{AQ}$, em 19% em relação ao 5Pil/$S_{AQ}$ e em 25% em relação ao 7Pil/AQ. Podendo-se obter 293kg de glicose e 98 kg de xilose por 1000kg de bagaço *in natura*, quando se extrapola os resultados da hidrólise da polpa obtida na condição do Ens 5Pil/AQ.

Eleita a condição com maior rendimento em açúcares, realizou-se a hidrólise em escala ampliada. As reações de hidrólise foram realizadas partindo de 0,7kg (base seca) de polpa, sob as mesmas condições utilizadas nas análises em shaker. A relação sólido: líquido utilizada foi de 1:10 em tampão citrato de sódio 0,05 mol.$L^{-1}$ pH 4,8, 50ºC por 72 h. As cargas enzimáticas foram de 10 FPU/g de material seco da enzima Celluclast 1.5 L e 20 UI/g de material seco da enzima β-glicosidase (Novozym 188).

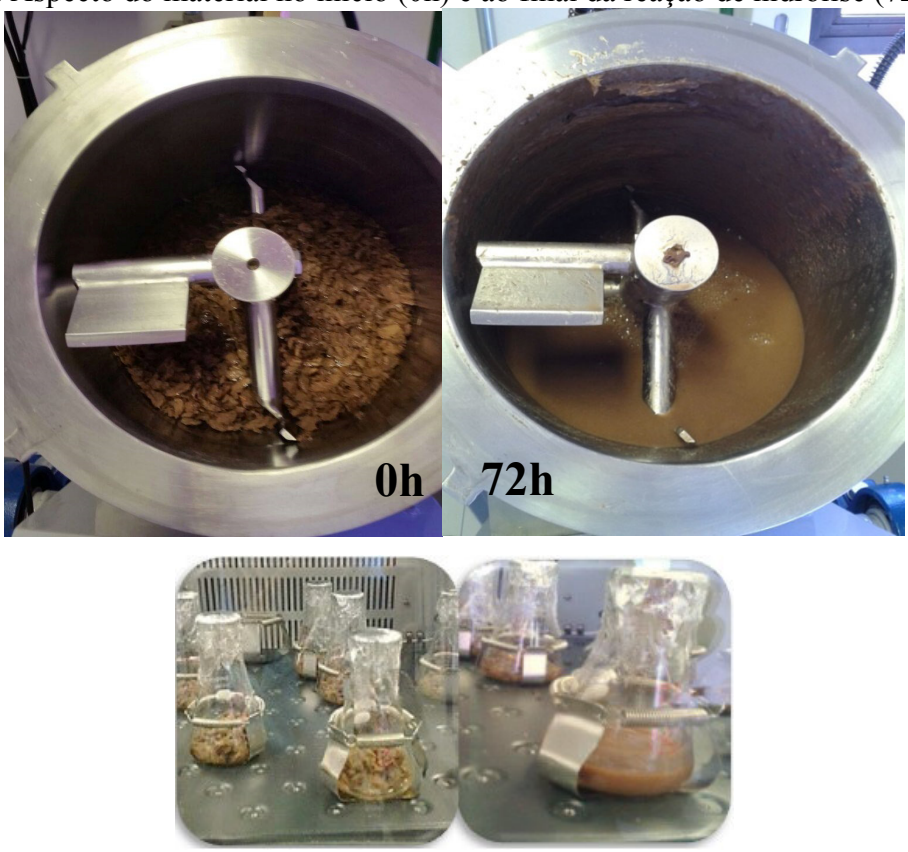
Obteve-se uma boa a reprodutibilidade dos dados em escala ampliada, como mostra a Tabela 19 que compara os resultados da hidrólise em shaker e no reator de 15L, com os respectivos desvios, tendo sido realizadas sete repetições da hidrólise em reator.

**Tabela 19.** Comparação dos resultados em shaker e reator para a hidrólise enzimática da polpa do Ens.5Pil/AQ.

| | Shaker | Reator |
|---|---|---|
| Conversão à Glicose (%) | 68,2 ± 0,3 | 67,1 ± 3,1 |
| Conversão à Xilose (%) | 62,4 ± 3,0 | 60,1 ± 2,5 |

A reprodutibilidade dos dados mostra a eficiência do sistema de agitação adotado no reator, igualando à agitação orbital, mesmo para essa amostra e tipo de reação, com grande variação da viscosidade do meio reacional com o tempo. A Figura 38 ilustra o aspecto do material no inicio (0h) e ao final da reação de hidrólise (após 72h), ocorrida no reator e em shaker.

**Figura 38.** Aspecto do material no inicio (0h) e ao final da reação de hidrólise (72h).




Fonte: Próprio autor.

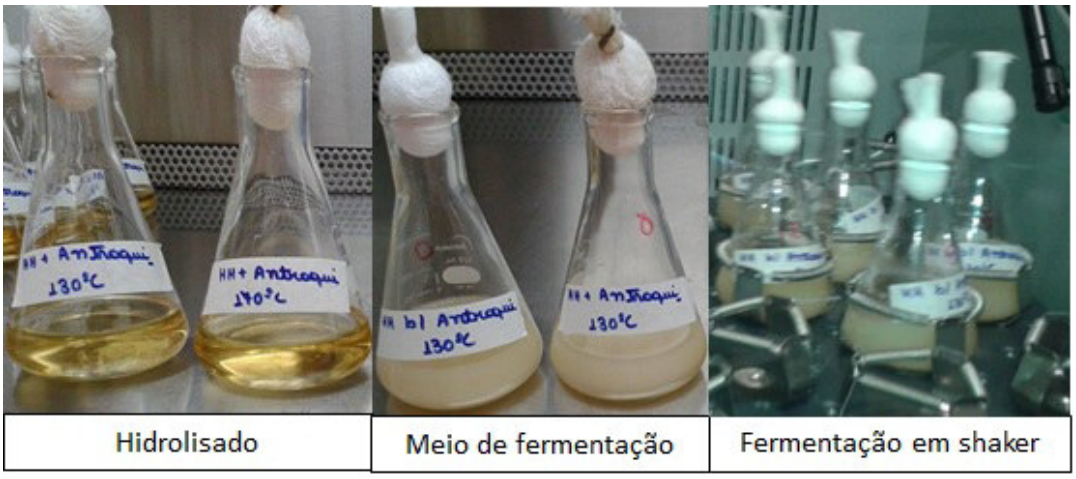
## 5.3 Fermentação

### 5.3.1 Fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1

Fermentações dos hidrolisados obtidos nas diferentes condições de pré-tratamento em escala piloto (170°C, 30 min, 1,5% NaOH com e sem AQ – HE-7Pil/AQ e HE-7Pil/SAQ, respectivamente e 130°C, 30 min, 1,5% NaOH com e sem AQ – HE-5Pil/AQ e HE-5Pil/SAQ, respectivamente) foram realizadas para averiguar o efeito da antraquinona no desempenho da levedura *S. cerevisiae CAT-1* na fermentação desses hidrolisados, já que a condição de pré-tratamento eleita com melhor rendimento em glicose inclui o uso da antraquinona.

A Figura 39 a seguir ilustra o hidrolisado obtido das polpas após a hidrólise enzimática, o meio de fermentação com o hidrolisado já suplementado e inoculado e a fermentação em *shaker*.

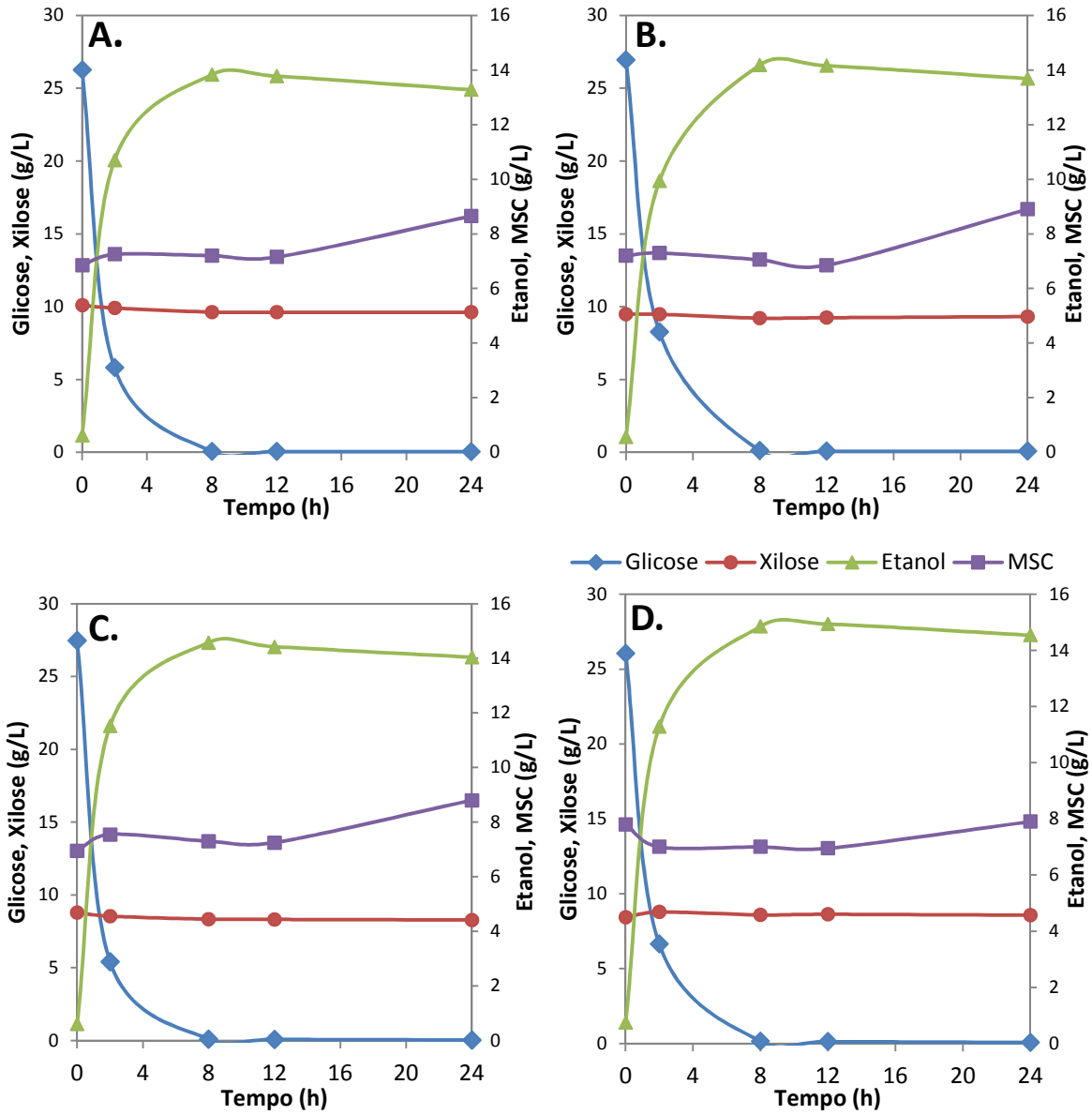
**Figura 39.** Apresentação dos hidrolisados e meio de fermentação para fermentação utilizando *S. cerevisiae* CAT-1.




Fonte: Próprio autor.

O perfil de consumo de açúcar, massa seca de células (MSC) e produção de etanol para as fermentações com *S. cerevisiae* dos hidrolisados provenientes das polpas obtidas nas quatro diferentes condições de pré-tratamento estudadas são apresentados na Figura 40.

**Figura 40.** Concentração de substratos e produtos por tempo na fermentação com *S. cerevisiae* CAT-1 para os diferentes hidrolisados testados. **A.** HE 5Pil/AQ; **B.** HE 5Pil/SAQ; **C.** HE 7Pil/AQ e **D.** HE 7Pil/SAQ




Fonte: Próprio autor.

Na fermentação com *S. cerevisiae CAT-1*, o hidrolisado enzimático das polpas de todas as condições de pré-tratamento estudadas (HE-5Pil/AQ; HE-5Pil/SAQ; HE-7Pil/AQ e HE-7Pil/SAQ) foram testados, sendo igualmente fermentados. Não se observou interferência do uso ou não da antraquinona na fermentação (Figura 40). Na Figura 40 pode-se observar ainda que, para todas as fermentações, ocorreu o consumo total da glicose em até 8h de fermentação. A produção de etanol foi em média 14,35 ± 0,45 g/L, com produtividade média de 1,71 ± 0,05 $g.L^{-1}.h^{-1}$. Nota-se ainda pela Figura 40 que a

concentração de xilose se manteve constante, em torno de 9g/L durante toda fermentação, uma vez que a levedura *S. cerevisiae* não possui capacidade de utilizar este substrato.

*S. cerevisiae* é o microrganismo tradicionalmente aplicado para a produção de etanol de mostos de primeira geração (melaço, xarope ou a mistura de ambos) devido à sua alta tolerância a etanol, resistência a pH baixo, altos rendimentos (acima de 90 %) e produtividade volumétrica (acima de 6 g/L.h) além de resistência a infecção por bacteriófagos, o que é particularmente relevante em processos industriais. Entretanto, a sua incapacidade de fermentar xilose, o segundo açúcar mais abundante na biomassa lignocelulósica, limita a sua utilização na produção de etanol de segunda geração (MOYSES *et al.*, 2016).

Testes mais aprofundados, foram realizados apenas para o hidrolisado da polpa proveniente do pré-tratamento HE-5Pil/AQ (130°C, 30 min, 1,5% m/v NaOH, 0,15% m/m AQ), o qual havia sido eleito anteriormente devido ao melhor rendimento de conversão enzimática. A fim de se obter volume de hidrolisado suficiente, foram realizadas sete hidrólises em reator de 15L da polpa proveniente do Ens. 5Pil/AQ, obtendo-se aproximadamente 6,2 L de hidrolisado após cada reação. A Tabela 20 apresenta a média para a caracterização deste hidrolisado.

**Tabela 20**. Caracterização do hidrolisado proveniente da sacarificação enzimática da polpa 5Pil/AQ (130°C, 30 min, 1,5% m/v NaOH, 0,15% m/m AQ).

| | **Glicose g/L** | **Xilose g/L** | **Ác. Fórmico g/L** | **Ác. Acético g/L** | **HMF g/L** | **Furfural g/L** | **Aromáticos totais* g/L** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **HE-5Pil/AQ** | 42,9±2,6 | 14,9±0,8 | nd | nd | nd | nd | 0,71±0,05 |

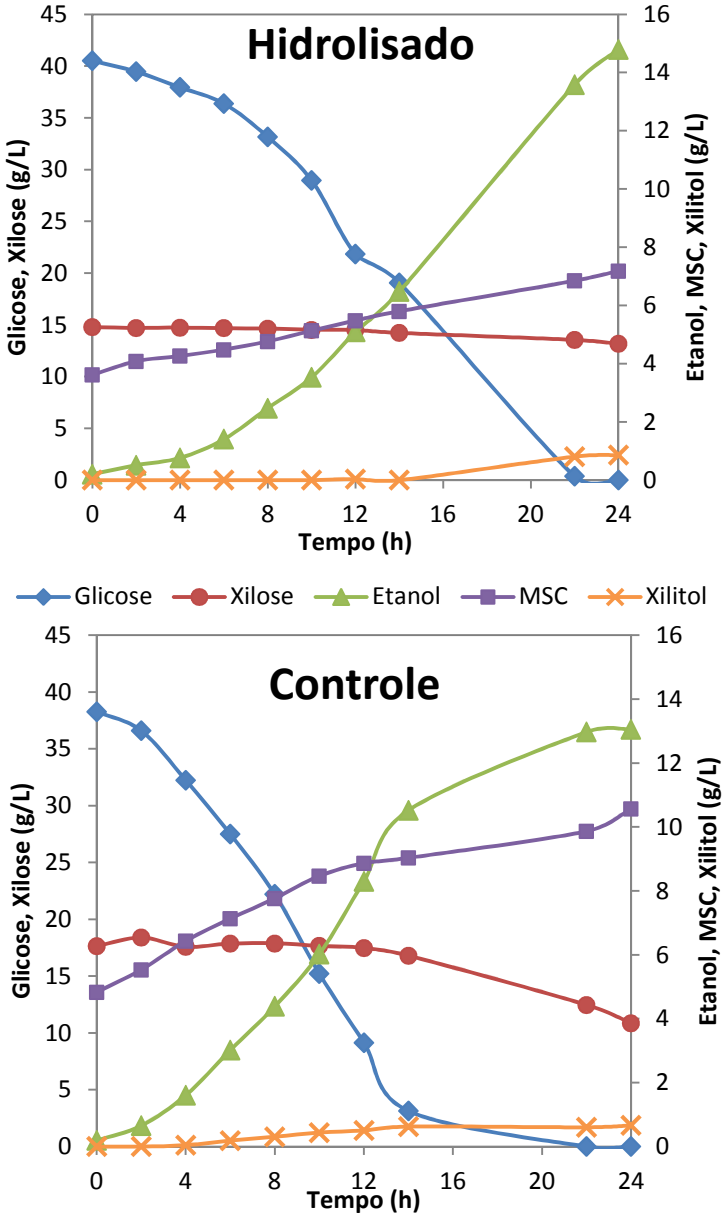
*Determinado por UV; nd= não detectado.

Devido à presença de um elevado teor de xilose nesse licor (proveniente da hidrólise enzimática da hemicelulose remanescente, que não é fracionada durante o processo de pré-tratamento), verificou-se a necessidade de uso de uma levedura capaz de utilizar este substrato, assim como a glicose presente no meio. Por este motivo, a levedura selvagem *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 foi selecionada.

### 5.3.2 Fermentação com *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124

O gráfico na Figura 41 mostra o perfil de células (base seca-MSC), consumo de açúcares e produção de etanol para a fermentação em *shaker* do hidrolisado e de uma amostra controle, que continha a mesma concentração de glicose e xilose do hidrolisado, mas com reagentes em grau analítico.

**Figura 41**. Concentração de células, produto e substrato por tempo de fermentação para o hidrolisado e amostra controle.




Fonte: Próprio autor.

É possível observar na Figura 41 que para o consumo de total de glicose foram necessárias 22 h de fermentação e que, apenas após a exaustão da glicose é que a xilose passou a ser consumida, ainda assim, houve consumo de apenas 20% da xilose disponível. Na fermentação controle, utilizando glicose e xilose grau analítico, houve um consumo mais rápido de glicose e maior de xilose, entretanto, há um decréscimo na produção de etanol em favor do crescimento celular. Na fermentação controle 45% da xilose disponível foram consumidas.

O experimento em *shaker* foi realizado sem controle de aeração. Segundo Klinner *et al.* (2005) *S. stipitis* inicia a atividade fermentativa em resposta a uma limitação de oxigênio, sendo a atividade ótima alcançada em condições microaerofílicas (1-15% de $O_2$).

Hou (2012) relatou que em fermentação com *S. stipitis*, em condições de anaerobiose, apenas 9% da xilose foi consumida em 124 h de fermentação em um meio contendo 30 g/L de xilose e 30 g/L de glicose. Para o mesmo meio de fermentação, em condições de aerobiose, *S. stipitis* consumiu sequencialmente os açúcares, tendo consumido primeiramente a glicose (24h) e depois a xilose (76h). Com o fim da disponibilidade de glicose (48h), Hou também relatou um decréscimo na produção de etanol em favor do crescimento celular.

As leveduras nativas capazes de utilizar pentoses descritas na literatura até o momento sofrem repressão na presença de hexoses, ou seja, o consumo de pentoses é negativamente afetado pela presença de hexoses, especialmente glicose e manose, mas essa desvantagem pode ser superada por estratégias de adaptação (WEBB; LEE, 1990; WATANABE *et al.*, 2011). Para o consumo efetivo dos açúcares presentes no hidrolisado, foi necessário usar de estratégias fermentativas, como a batelada alimentada e o reciclo de células, visto a preferência de *S. stipitis* por glicose.

Nos processos realizados em batelada alimentada, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio. A batelada alimentada permite o controle da concentração de açúcar, minimizando os efeitos de inibição pelo substrato e permitindo a adição dos mesmos nos momentos mais propícios durante a fermentação (McNEIL; HARVEY, 1990). Além disso, é possível trabalhar com altas concentrações de substrato, o que leva ao acréscimo da produtividade em etanol e à diminuição da quantidade de vinhaça produzida e do volume necessário de reatores quando pensado em escala industrial.

Assim, uma nova etapa de fermentação por *S. stipitis* em batelada alimentada aplicando reciclo de células foi realizada, visando o consumo integral dos açúcares disponíveis no hidrolisado.

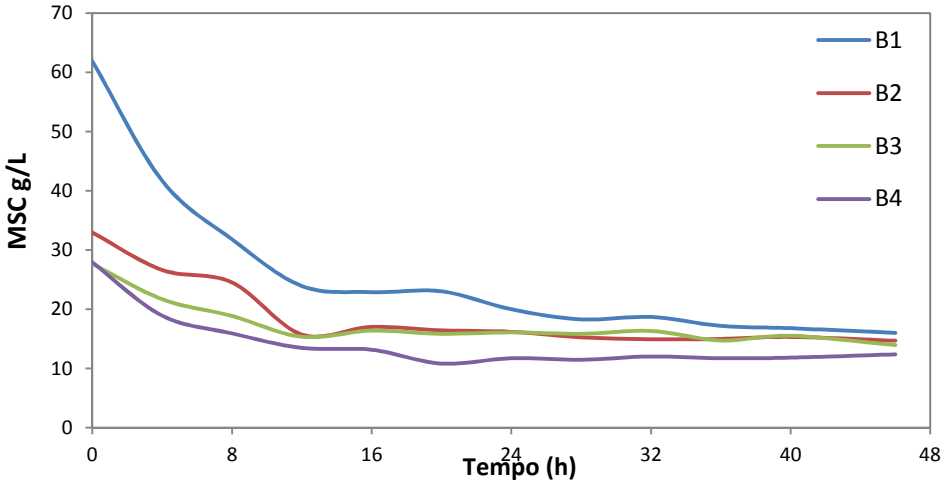
### 5.3.3 Fermentação com *Scheffersomyces stipitis* em batelada alimentada com reciclo de células

A fermentação em batelada alimentada foi realizada em bioreator Bioflo® 115 (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) , com volume final de trabalho de 0,7 L, pH 5,00, com agitação de 200 rpm e aeração de 0,1 Lpm. O volume de inóculo adicionado correspondeu a 1/3 do volume de trabalho, sendo a concentração final de células, com o reator alimentado, de 20 g/L. A alimentação do hidrolisado foi realizada com vazão de 30 mL/h durante 15 h, visando a alimentação de 40 g/L de açúcares, baseado em trabalho anterior realizado pelo grupo (SANTOS *et al.*, 2016).

Após cada batelada alimentada, todo volume do reator foi drenado, centrifugado e as células ressuspensas no volume de inóculo (233 mL) para nova batelada. Antes de cada nova batelada realizou-se o tratamento ácido das células. O tratamento com ácido proporciona a ruptura dos flocos e possibilita a remoção de compostos inibidores do meio intracelular para fermentações com *S. stipitis* (SANTOS *et al*., 2015).

Esperava-se iniciar com 60 g/L de células (massa seca) e, após a alimentação do sistema, a concentração final seria de 20 g/L de células (massa seca). Entretanto, acompanhando a concentração de células determinada por massa seca (Figura 42), a concentração de células diminui da primeira para a segunda batelada. Isso pode ter ocorrido em função da pouca estabilidade de *S. stipitis* frente a elevadas concentrações de etanol.

**Figura 42**. Concentração de células (g/L) por tempo de fermentação para cada batelada. A concentração diminui nas primeiras 15 horas devido à alimentação do sistema.




Fonte: Próprio autor.

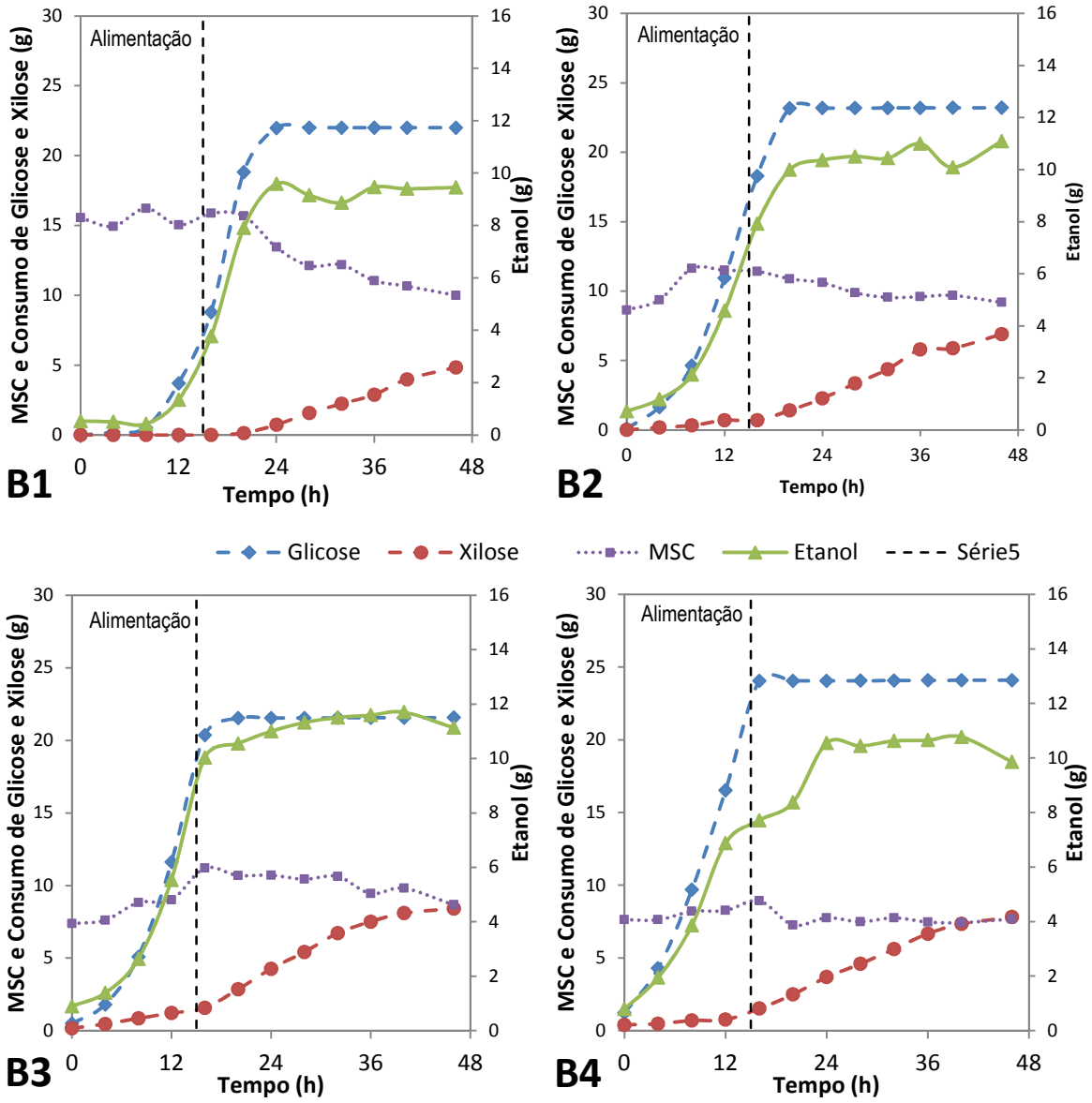
Cada batelada alimentada subsequente foi realizada diminuindo 1 grau da temperatura de trabalho. Temperaturas menores que 30°C, podem aumentar a tolerância da *S. stipitis* ao etanol (SANTOS *et al*., 2015). Assim, tendo iniciado a primeira batelada a 30°C, a segunda foi realizada a 29°C até a quarta, a 27°C. Segundo Santos *et al*. (2016) a melhora no consumo de xilose está mais associada à diminuição da temperatura a cada ciclo e menos marcadamente associada ao reciclo das células. Já o aumento na produção de etanol parece ser mais influenciado pela condição de reciclo das células, que permite a adaptação e condicionamento do microrganismo a eventuais estados deletérios intrínsecos ao sistema de fermentação (SANTOS *et al.*, 2016).

Os gráficos da Figura 43 mostram o perfil de consumo de açúcares (glicose e xilose), massa de células base seca (MSC) e produção de etanol (em g) para cada batelada alimentada na fermentação com *S. stipitis*. Como o sistema é em batelada alimentada os resultados são apresentados em massa (g) de açúcar consumido.

Observa-se pela Figura 43 que o consumo da xilose é lento na primeira batelada, seguindo o perfil da fermentação feita em *shaker*. Com o reciclo das células, diminui-se gradualmente o tempo para assimilação dos açúcares, aumentando ligeiramente o etanol produzido.

A glicose, na primeira batelada, é consumida em 24 h de fermentação. Nesse período apenas 10% da xilose fornecida é consumida. Após a exaustão da glicose a xilose é majoritariamente consumida, chegando a 70% de consumo da xilose fornecida. Apesar de haver consumo de xilose, não há aumento na produção de etanol após a exaustão da glicose. Uma possível explicação para o consumo da xilose e o não aumento da produção de etanol na primeira batelada seria a conversão deste carboidrato em outros produtos não analisados.

**Figura 43.** Perfil de fermentação mostrando consumo de açúcares, massa de células (base seca, DCW) e produção de etanol (em g) para cada reciclo da fermentação em batelada alimentada com *S. stipitis*.

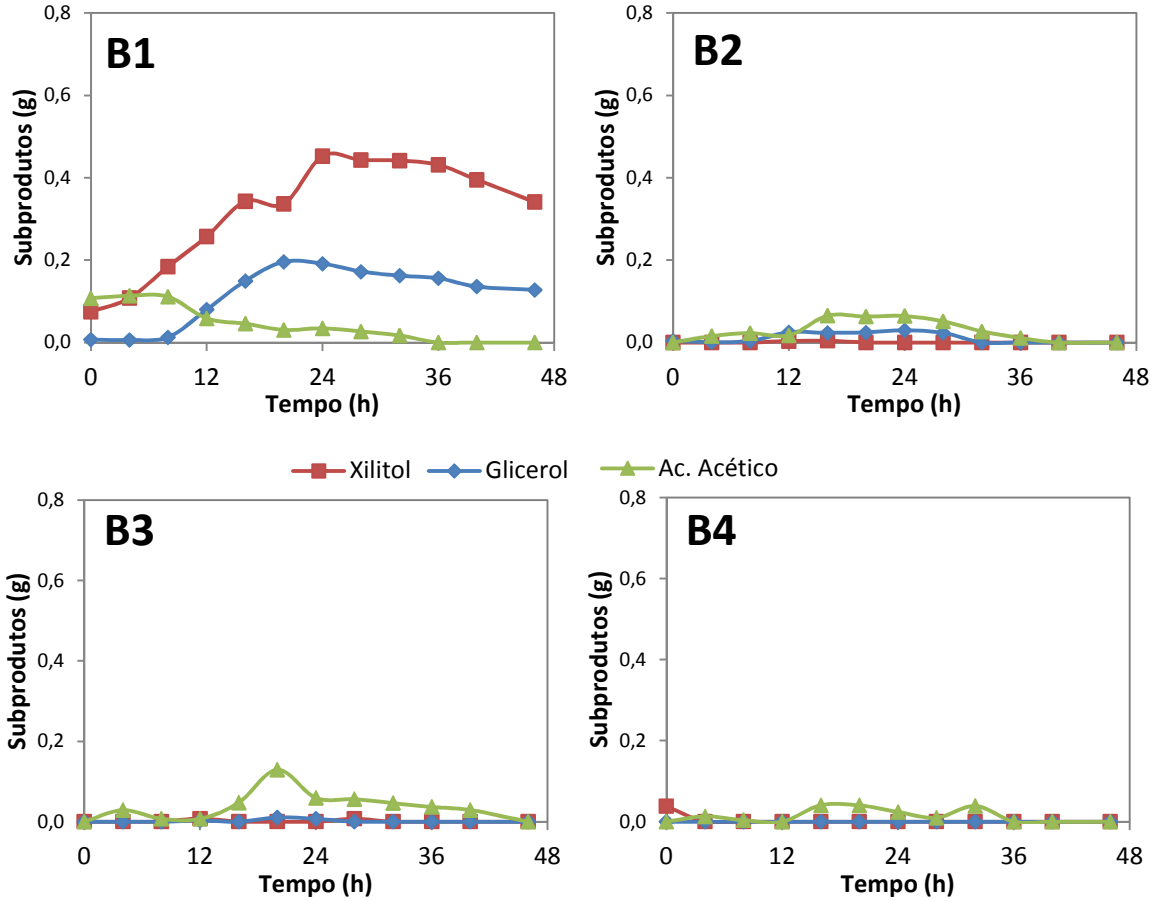



Fonte: Próprio autor.

Os gráficos da Figura 44 mostram a formação de alguns subprodutos (glicerol, xilitol e ácido acético) no decorrer de cada batelada. Na primeira batelada, observa-se produção de xilitol, glicerol e ácido acético. A concentração dos subprodutos medidos a cada batelada é baixa, sendo o xilitol o mais produzido, atingindo apenas 0,6 g/L ao final da primeira batelada. Nas bateladas seguintes a formação de subprodutos é menor, quase zerando sua formação.

Nas primeiras 24 h da primeira batelada, há um consumo muito pequeno de xilose, que é convertida em xilitol e glicerol (Fig. 44). Nas horas seguintes, ainda para a primeira batelada, há um consumo de aproximadamente 6 g/L de xilose. Somando os subprodutos formados, é possível identificar apenas 15% da xilose consumida. Outros subprodutos que não foram medidos neste trabalho podem ser acumulados, Su et al. (2015) propuseram uma via metabólica para fermentação das pentoses por leveduras (incluindo a glicólise, via das pentoses fosfato e um ciclo tricarboxílico simplificado) e nessa via, mostraram que outros polióis podem ser acumulados, como o ribitol, a acetoína e o 2,3 butanodiol.

**Figura 44**. Subprodutos (glicerol, xilitol e ácido acético) formados em cada batelada para a fermentação com *S. stipitis*.




Fonte: Próprio autor.

Outra explicação mais provável para o destino da xilose seria a formação de massa celular. *S. stipitis* é uma levedura Crabtree negativa e em condições de aerobiose apresenta crescimento exponencial (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008). Pode-se afirmar que há crescimento de células pelo carboidrato consumido, mesmo não tendo sido observado

aumento na massa de célula (e havendo diminuição na concentração de células para cada batelada como já mostrado na Figura 42), pois a condiçao de microaerofilia foi mantida durante a fermentação. Essa contradição pode ser explicada pela observação do que acontece no reator. Pela caracteristica floculante e pela baixa resistência ao etanol apresentada pela *S. stipitis*, com o aumento da concentração de etanol no meio de fermentação, as células de *S. stipitis* floculam e ficam aderidas à parede do reator, não sendo possível quantificar de forma exata o aumento de massa de célula. A Figura 45 mostra o reator ao final da batelada de fermentação.

**Figura 45**. Leveduras floculadas ao fim da batelada de fermentação por *S. stipitis*.

Fonte: Próprio autor.

Para as bateladas seguintes, após a exaustão da glicose no meio, observa-se um aumento no etanol produzido pelo consumo da xilose. Também se observa a partir da segunda batelada, que nas primeiras 20 horas de fermentação, há um consumo lento da xilose (devido à presença de glicose) e um aumento na massa de células. Quando a concentração de etanol atinge 15 g/L, não mais se observa esse aumento de massa celular.

A Tabela 21 mostra os parâmetros de rendimento (g de P/g de S), rendimento em relação ao teórico (%), máxima produção de etanol (g/L), produtividade volumétrica (g/L.h), porcentagem de consumo de glicose e xilose e o tempo de fermentação, para cada batelada alimentada.

**Tabela 21**. Parâmetros de fermentação com *S. stipitis* para cada batelada alimentada.

| | *S. stipitis* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Y p/s (g de P/g de S) | Produtiv. Vol. (g/L.h) | Etanol (g/L) | Rendimento (%) | Consumo de glicose (%) | Consumo de xilose (%) | Tempo de Ferm. (h) |
| **B1** | 0,352 | 0,311 | 15,2 | 69 | 100 | 72 | 48 |
| **B2** | 0,368 | 0,361 | 17,8 | 72 | 100 | 89 | 48 |
| **B3** | 0,371 | 0,359 | 17,9 | 73 | 100 | 99 | 48 |
| **B4** | 0,309 | 0,318 | 17,2 | 61 | 100 | 99 | 48 |

As fermentações com *S. stipitis* apresentaram resultados entre 15,2 e 17,9 g/l de produção de etanol, provando que as técnicas de reciclo de células e fermentação em batelada alimentada são passíveis de serem aplicadas para esta levedura, aumentando a produtividade em etanol. Estas estratégias também foram efetivas para o consumo dos açúcares, sendo possível consumir tanto a pentose quanto a hexose disponibilizadas em 48h de fermentação; diferente do resultado observado na fermentação em *shaker*, em que o açúcar total disponível não foi consumido. A fermentação em batelada alimentada com reciclo de células obteve eficiência máxima de 73% do teórico.

A Tabela 22 sumariza alguns resultados que vem sendo apresentados na literatura para obtenção de etanol por *S. stipitis*. Não se devem comparar apenas valores, é preciso considerar o substrato que esta sendo fermentado (xilose, glicose e xilose, hidrolisado de biomassa, fração celulósica, hemicelulósica ou ambas) e o tempo de fermentação.

Okonkwo *et al.* (2016) e Unrean *et al.* (2013) relataram produtividade próximas ao valor obtido neste trabalho (perto de 0,36 g/L.h), mas utilizaram glicose e xilose ao invés de hidrolisado e realizaram fermentação de 100 h. Yadav *et al.* (2011) utilizou hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e obteve bons resultados para fermentação de *S. stipitis* em co-cultura com *S. cerevisiae*. Fu *et al.*, 2009 alcançaram produtividade de 1,27 g/L.h em 19h de fermentação fazendo co-cultura com *Zymomonas mobilis*.

Canilha *et al.* (2010), Ferreira *et al.* (2011) e Melissi *et al*. (2015) apresentam resultados para fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço, relatando menor produtividade em relação ao obtido neste trabalho, com máxima de 0,19 g/L.h. Vale ressaltar que, diferentemente destes três trabalhos, o presente trabalho não utilizou hidrolisado hemicelulósico, e sim um hidrolisado misto, com maior proporção de hexose que pentose.

A maior produtividade relatada na literatura é apresentada por Santos *et al.* (2015) alcançando 2,16 g/L.h em 15 horas de fermentação após 5 reciclos. Santos fermentou

xilose e glicose com maior proporção em xilose (70%), mas nesse período de 15 h a *S. stipitis* só conseguiu consumir 49% da xilose disponível.

Apesar dos ótimos resultados obtidos neste trabalho para a fermentação com *S. stipitis*, como se trata de um hidrolisado contendo 70% de hexose, que poderia ser consumida por *S. cerevisiae* em menor tempo e com maior eficiência, optou-se por testar outra levedura, *Spathaspora passalidarum*, que também é capaz de consumir pentoses e hexoses, e tem resultados promissores apresentados na literatura.

**Tabela 22**. Resultados apresentados na literatura para produção de etanol por *S. stipitis*.

| Referência | Material fermentado | Microrganismo | Açúcar inicial (g/L) | Etanol final (g/L) | Tempo (h) | Eficiência (% do teórico) | Y p/s (g EtOH/ g açúcar) | Produtividade (g/L.h) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Okonkwo *et al.*, 2016** | Glicose + Xilose + $CaCO_3$ | *Scheffersomyces stipitis* | 67(gli) + 43(xil) | 47,3 | 100 | 84 | | 0,39 |
| **Santos *et al.*, 2015** | Glicose + Xilose | *Scheffersomyces stipitis* | 30(gli) + 70(xil) | 34,5 | 15 | 67 | 0,43 | 2,16 |
| **Milessi *et al.*, 2015** | Hidrolisado hemicelulósico de bagaço | *Scheffersomyces stipitis* imobilizada | 30 | 8,9 | 72 | | 0,33 | 0,185 |
| **Unrean *et al.*, 2013** | Glicose + Xilose | *Scheffersomyces stipitis* fermentação em fed-batch | 200 | 40,7 | 100 | | 0,40 | 0,42 |
| **Yadav *et al.*, 2011** | Hidrolisado de palha de arroz pretratado por ácido diluído | Co-cultura de *Saccharomyces* e *Pichia stipitis* | 30 | 12 | 48 | 95 | 0,40 | 0,33 |
| **Ferreira *et al.*, 2011** | Hidrolisado hemicelulósico de bagaço | *Scheffersomyces stipitis* | 30 | | 48 | | 0,19 | 0,13 |
| **Canilha *et al.*, 2010** | Hidrolisado hemicelulósico de bagaço | *Scheffersomyces stipitis* | 25 | 7,5 | 48 | 61 | 0,30 | 0,16 |
| **Fu *et al.*, 2009** | Glicose + Xilose | Co-cultura de *Zymomonas mobilis* e *Pichia* | 30(gli) + 20(xil) | | 19 | 96 | 0,50 | 1,27 |
| **Este trabalho** | Hidrolisado enzimatico de bagaço de cana pretratado NaOH/AQ | *S. stipitis* usando fermentação em fed-batch e reciclo | 34(gli) + 13(xil) | 18,5 | 48 | 73 | 0,37 | 0,36 |

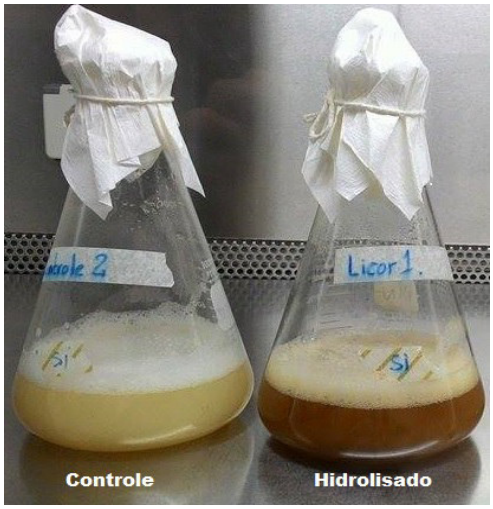
### 5.3.4 Fermentação com *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907

*Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 é uma levedura capaz de fermentar pentoses em sua forma nativa. Estudos mostram que ela é capaz de fermentar xilose mais rapidamente do que a glicose e pode co-utilizar a glicose, xilose e celobiose como fontes de carbono (HOU, 2012; LONG *et al*., 2012; NGUYEN *et al.*, 2006).

*S. passalidarum* e *S. stipitis* estão intimamente relacionadas tanto taxonômica quanto ambientalmente. Ambas são encontradas no intestino de larvas e de besouros adultos, e pertencem ao subtipo "CUG" de leveduras em que a serina substitui a leucina quando encontra um CUG no seu RNA mensageiro (WOHLBACH *et al.*, 2011). A evolução dessas leveduras em associação com besouros que vivem no interior de madeiras em decomposição é, provavelmente, o fator responsável por suas capacidades de metabolizar uma grande variedade de açúcares lignocelulósicos e suas capacidades para crescer a baixas tensões de oxigênio (SU *et al.*, 2015).

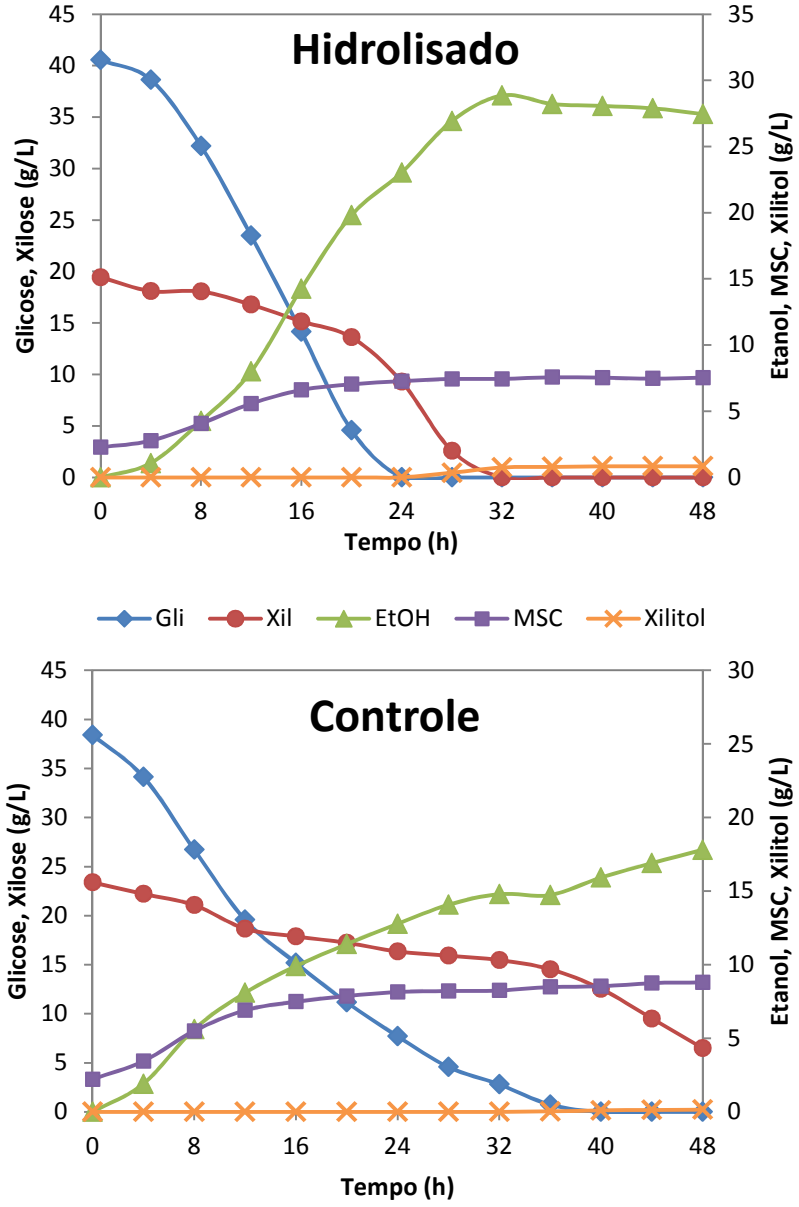
Neste sentido, utilizou-se *S. passalidarum* para fermentação em *shaker* com a finalidade de avaliar o perfil de consumo dos açúcares durante a fermentação. Os meios utilizados para o teste foram: o hidrolisado, proveniente do Ens 5Pil/AQ e; uma amostra controle, contendo a mesma concentração de glicose e xilose do hidrolisado. A Figura 46 ilustra o hidrolisado e o controle, suplementados e inoculados para a fermentação em *shaker* utilizando *S. passalidarum*. O gráfico na Figura 47 mostra o perfil de consumo dos açúcares e produção de etanol para essa fermentação.

**Figura 46**. Hidrolisado e o controle, suplementados e inoculados para a fermentação em *shaker* utilizando *S. passalidarum*.




Fonte: Próprio autor.

**Figura 47**. Perfil de consumo de açúcares, massa seca de células e produção de etanol e xilitol para fermentação em *shaker* por *S. passalidarum*.




Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos nas fermentações em *shaker* (Figura 47) mostram que essa levedura é capaz de consumir tanto glicose como xilose, produzindo 28,85 g/L de etanol (94% do teórico) com uma eficiência em etanol $Y_{P/S}$ de 0,48 g/g e Qp de 0,9 g/L.h quando o hidrolisado foi utilizado. *S. passalidarum* foi capaz de consumir todo açúcar presente no hidrolisado em 32 h, enquanto no ensaio controle, com as mesmas proporções de glicose e xilose do hidrolisado, isso não foi possível em 48h. Alguns elementos presentes no hidrolisado podem ter contribuido para essa assimilação mais rápida que no controle.

*du* Preez (1994) relatou que a composição e condições de meio de cultura exercem um efeito significativo sobre a fermentação de xilose. Neste trabalho Preez relatou que para *S. stipitis* o uso de biotina e tiamina aumentou dramaticamente tanto rendimento como produtividade em etanol. Outros trabalhos não observaram esse aumento de rendimento pela suplementação com biotina e tiamina. *du* Preez (1994) ainda relatou a diferença no uso de fontes de nitrogênio orgânica e inorgânica. Fontes de nitrogênio orgânicas, tal como ureia, melhoraram o rendimento do etanol obtido com *C. shehatae* em comparação com as fontes de nitrogênio inorgânicas.

A adição de microelementos em células de levedura é de particular interesse durante a fermentação alcoólica. Alguns microelementos como o zinco, cobre, cromo e ferro podem influenciar a estabilidade das membranas celulares, bem como a síntese de ácidos nucleicos e a estabilidade da dupla hélice do DNA (ZETIC *et al.*, 2001).

Slinninger *et al.* (2006) em um trabalho sobre otimização de fonte de nitrogênio e mineral para aumentar a conversão de xilose a etanol pela levedura *S. stipitis* NRRL Y-7124 relatou a importância da relação carbono/ nitrogênio e da combinação de fontes de nitrogênio com outros grupos de nutrientes, que interagem afetando a eficiência da produção de etanol a partir de xilose. Slinninger *et al.* (2006) mostrou nos seus resultados que, em culturas estacionárias fornecendo aminoácidos como fonte de nitrogênio, a concentração de etanol aumentou de 24 para 54 g/ L, com a adição optimizada de um suplemento mineral (contendo Fe, Mn, Mg, Ca, Zn, e outros).

O ensaio em *shaker* mostra o potencial do hidrolisado obtido neste trabalho, juntamente com a levedura *S. passalidarum*, para a aplicação na produção de etanol 2G, levando aos ensaios em biorreator, aplicando o reciclo de células e o sistema em batelada alimentada, do mesmo modo como foi testado para a *S. stipitis*.

### 5.3.5 Fermentação com *Spathaspora passalidarum* em batelada alimentada com reciclo de células

A fermentação em batelada alimentada foi realizada do mesmo modo que para a *S. stipitis*, em bioreator Bioflo® 115 (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ), com volume final de trabalho de 0,7 L, pH 5,00, com agitação de 200 rpm. Diferentemente da fermentação com *S. stipitis*, a fermentação com *S. passalidarum* foi realizada sem

microaeração. Hou (2012) demonstrou que a *S. passalidarum* em condições anaeróbias desempenha alto rendimento em produção de etanol.

O volume de inóculo adicionado correspondeu a 1/3 do volume de trabalho, sendo a concentração final de células, com o reator alimentado, de 20 g/L. A alimentação do hidrolisado foi realizada com vazão de 30 mL/h durante 15 h. Após cada batelada alimentada, todo volume do reator foi drenado, centrifugado e as células ressuspensas no volume de inóculo (233 mL) para nova batelada alimentada. Antes de cada nova fermentação realizou-se o tratamento ácido das células, assim como feito para a *S. stipitis*.

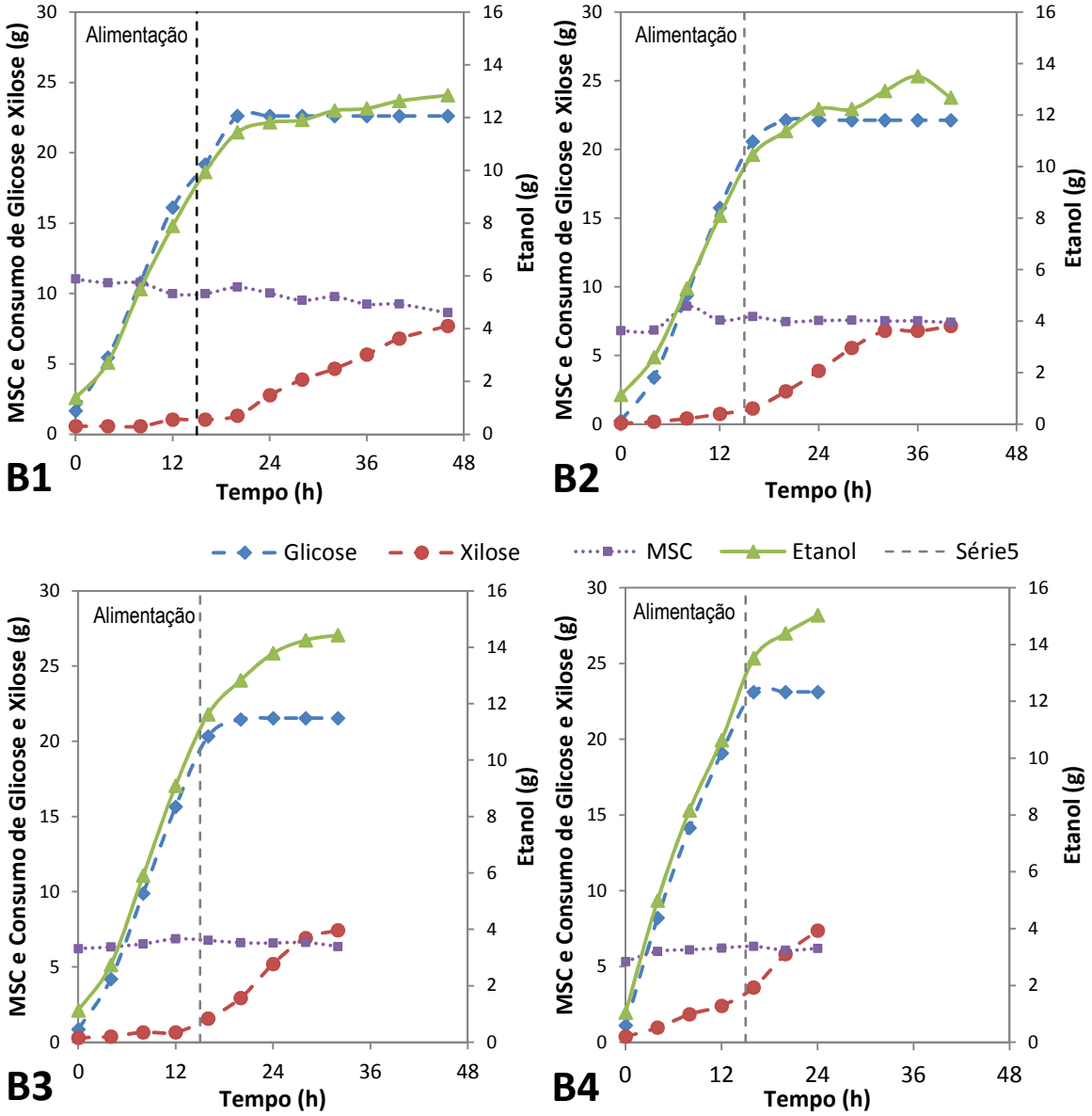
Não foram encontrados na literatura trabalhos relatando os efeitos do tratamento ácido para *S. passalidarum*. As análises de viabilidade celular realizadas durante este trabalho mostraram que a *S. passalidarum* é resistente ao tratamento ácido, mantendo acima de 93% a taxa de células viáveis mesmo após o terceiro reciclo (quatro bateladas alimentadas sucessivas). Cada batelada alimentada subsequente foi realizada diminuindo 1 grau da temperatura de trabalho.

O consumo dos açúcares, a massa de células (base seca) e a produção de etanol, em gramas, para cada batelada são apresentados nos gráficos da Figura 48.

Observando o perfil de consumo dos açúcares durante os reciclos para a fermentação com *S. passalidarum* (Figura 48), vê-se que o consumo total de glicose se deu em 20h já na primeira batelada, da mesma forma que para a fermentação em *shaker*. Com os reciclos, o tempo de consumo da glicose diminui para 16h.

O consumo total da xilose se deu após 48h de fermentação na primeira batelada, diferente do que ocorreu na fermentação em *shaker*, em que a xilose foi consumida em 32h. Provavelmente, esse fato é devido à adaptação necessária da célula, pois no teste em biorreator, as células foram propagadas em xarope (sacarose), enquanto que para o teste em *shaker*, o crescimento foi feito em meio YPX (10g/L - extrato de levedura; 20 g/L - peptona; e 20 g/L - xilose). Contudo, o tempo de assimilação da xilose é diminuído a cada reciclo, sendo possível consumir praticamente toda xilose em 24h na última batelada alimentada. A cada reciclo, a produção de etanol aumenta ligeiramente, alcançando 23,3 g/L de etanol (97% do teórico) em 24h de fermentação na última batelada. Ressalta-se que a concentração de etanol não foi superior a 23 g/L devido à disponibilidade de açúcares durante a fermentação. Na literatura, Su *et al.*, (2015) apresenta resultados de 60 g/L de etanol para a fermentação da mistura de xilose e glicose por *S. passalidarum*.

**Figura 48**. Perfil de fermentação mostrando consumo de açúcares, massa de células (base seca, MSC) e produção de etanol, em g, para cada reciclo da fermentação com *S.passalidarum*.




Fonte: Próprio autor.

**Tabela 23**. Parâmetros de fermentação por *S. passalidarum* para cada batelada alimentada.

| | *S. passalidarum* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Y p/s (g de P/g de S) | Etanol (g/L) | Produtiv. Vol. (g/L.h) | Rendimento (%) | Consumo de glicose (%) | Consumo de xilose (%) | Tempo de Ferm. (h) |
| **B1** | 0,42 | 21,6 | 0,420 | 83 | 100 | 100 | 48 |
| **B2** | 0,43 | 20,5 | 0,468 | 85 | 100 | 97 | 40 |
| **B3** | 0,50 | 22,8 | 0,656 | 98 | 100 | 100 | 32 |
| **B4** | **0,49** | **23,3** | **0,903** | **97** | **100** | **94** | **24** |

A Tabela 23 mostra o rendimento em relação ao teórico, a máxima produção de etanol (g/L), a produtividade (g/L.h), porcentagem de consumo de glicose e xilose e o tempo de fermentação (h), para cada batelada da fermentação com *S. passalidarum*.

A produtividade volumétrica de etanol aumenta ao longo das bateladas alimentadas e, consequentemente, o tempo necessário para o consumo total dos açúcares diminui, variando de 0,42 g/L.h na primeira batelada para 0,90 g/L.h na quarta batelada, alcançando 23,3 g/L de etanol (97% do teórico).

Vários estudos vêm sendo realizados utilizando *S. passalidarum* para a produção de etanol. A Tabela 24 sumariza alguns resultados.

Souza (2014), em sua dissertação de mestrado propõe produzir etanol a partir de hidrolisado enzimático do bagaço da cana-de-açúcar por leveduras isoladas do bioma amazônico. Neste trabalho o autor utilizou pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para o bagaço. Dentre as leveduras utilizadas na fermentação de xilose em meio sintético, a levedura *S. passalidarum* HM 14.2 foi a linhagem que apresentou a maior produção de etanol 16,01 g/L e maior produtividade 0,22 g/L.h. O rendimento da *S. passalidarum* HM 14.2 após 72 h de fermentação do hidrolisado enzimático foi de 0,32 g/g e a produtividade 0,34 g/L.h.

Melo (2013) determina algumas características como temperaturas máximas de crescimento e de fermentação, e tolerância ao etanol, que interferem na fisiologia das linhagens da levedura. As linhagens de *S. passalidarum* foram capazes de crescer entre as temperaturas de 38°C a 41°C, com capacidade de fermentar D-xilose a etanol nas temperaturas de 34°C a 39°C e com tolerância máxima de 4% (v/v) de etanol. Nas fermentações em condições moderada de oxigenação (agitação a 180 rpm com vedação rolha gaze), a eficiência de conversão dos açúcares a etanol (Yp/s) e a produtividade (Qp) variaram de 0,33 a 0,47 g/g e 0,21 a 0,43 g/L.h, enquanto para as fermentações em condições limitantes de oxigenação (agitação a 120 rpm com vedação anel de silicone e tampa de rosca) os valores variam entre 0,30 a 0,61 g/g para a eficiência de conversão dos açúcares a etanol e entre 0,10 a 0,22 g/L.h para a produtividade. As quantidades observadas de subprodutos da fermentação como xilitol e glicerol, em ambas as condições de oxigenação avaliadas foram baixas. Na fermentação em biorreator sob condição limitante de oxigenação, utilizando hidrolisado de casca de soja sem suplementação ou processo de destoxificação, foram encontrados valores de Yps = 0,25 g/g e Qp = 0,02 g/L.h, com a produção máxima de 3,8 g/L de etanol.

Hou (2012) fez um estudo comparativo da fermentação de duas leveduras que fermentam xilose, *S. stipitis* e *S. passalidarum*. Nesse estudo, ele demonstrou que a *S. passalidarum* em condições de anaerobiose alcança altos rendimentos em etanol além de rápido crescimento celular, sendo capaz de consumir xilose após o consumo de glicose enquanto que, em condições de aerobiose, *S. passalidarum* consume xilose e glicose simultaneamente. Em comparação, a outra levedura *S. stipitis*, em condição de anaerobiose, foi quase incapaz de utilizar a xilose. Em condições aeróbicas, *S. stipitis* apresentada consumo sequencial de açúcar, utilizando primeiro a glicose e, em seguida, xilose. Hou destaca que a necessidade de condições de microaeração torna o processo difícil e caro, o que torna a *S. passalidarum* promissora para aplicações em maior escala. Nos seus resultados, relata para fermentação de 30/30 g/L de xilose e glicose por *S. passalidarum* a produção de 30 g/L de etanol em 96 horas de fermentação em condições de anaerobiose e 25 g/L de etanol em 24h de fermentação em condiçoes de aerobiose (consumo simultaneo de glicose e xilose). Para essa mesma fermentação pela *S. stipitis*, Hou relatou ainda o consumo de apenas 9% da xilose disponível em 96 h de fermentação em condições de anaerobiose e, em condições de aerobiose a *S. stipitis* requer 72h para consumo total da xilose e produz apenas 13 g/L de etanol. Vale ressaltar que no presente trabalho o sistema de batelada alimentada com reciclo de células não apresenta as mesmas caracteristicas do trabalho realizado por Hou (2012) e estudos mais detalhados da importancia da manutenção de baixas concentrações de oxigenio dissolvido no meio de cultura devem ser realizados para se entender o real benenficio desse nutriente para a fermentação de pentoses por *S. passalidarum*.

Su *et al.* (2015) estudou os efeitos da aeração sobre o crescimento, a produção de etanol e o acúmulo de polióis por *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 e *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124, afirmando que a otimização da aeração desempenha um papel crucial na maximização da produção de bioetanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos. Comparando a cinética de fermentação de *S. passalidarum* e *S. stipitis*, durante a fermentação de glicose, xilose, ou uma mistura de xilose e glicose (80/20) sob quatro diferentes condições de aeração, Su *et al.* (2015) observaram que as máximas concentrações de etanol ocorreram entre 72 e 120 horas de fermentação, dependendo das condições de aeração. A concentração mais elevada de etanol foi de 58,3 g/L a partir da fermentação da mistura de glicose e xilose no nível mais baixo de aeração (2,47 mmol $O_2$/ L.h). A menor aeração também produziu o rendimento mais elevado de etanol, 0,45 g/ g a partir de 150 g/ L de xilose e, a mais alta produtividade específica de

etanol, 0,153 g de etanol/ gCDW.h. Aumentando a aeração para 4,27 mmol $O_2$ /L.h, Su *et al*. (2015) observa que o rendimento em etanol diminui enquanto a produtividade volumétrica aumenta. Ambas as leveduras apresentaram menores rendimentos em células e maiores rendimentos em etanol quando crescendo em xilose que em glicose. *S. passalidarum* secretou quantidades menores de polióis em comparação com *S. stipitis* na maioria das circunstâncias.

**Tabela 24**. Resultados apresentados na literatura para produção de etanol por *S. passalidarum*.

| Referência | Material fermentado | Microrganismo | Açúcar inicial (g/L) | Etanol final (g/L) | Tempo (h) | Eficiência (% do teórico) | Y p/s (g EtOH/ g açúcar) | Produtividade (g/L.h) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Su, 2015** | Glicose + Xilose | *Spathaspora passalidarum* | 30 (gli) + 120(xil) | 58,3 | 120 | 76 | 0,425 | 0,649 |
| **Souza, 2014** | Hidrolisado enzimático de bagaço pretratado por $H_2O_2$ alcalino | *Spathaspora passalidarum* | | 16,01 | 72 | 67 | 0,32 | 0,34 |
| **Melo, 2013** | Hidrolisado hemicelulósico de casca de soja | *Spathaspora passalidarum* | | 3,8 | | | 0,25 | 0,02 |
| **Long, 2012** | Hidrolisado hemicelulósico de carvalho (maple) | *Spathaspora passalidarum* | 65 (gli) + 38 (xil) | 36 | 60 | 68 | | |
| **Hou, 2012** | Glicose + Xilose | *Spathaspora passalidarum* | 30 (gli) + 32 (xil) | 25 | 24 | 82 | | |
| **Este trabalho** | Hidrolisado enzimatico de bagaço de cana pré-tratado NaOH/AQ | *S. passalidarum* usando fermentação em fed-batch e reciclo | 34(gli) + 13(xil) | 23 | 24 | 97 | 0,493 | 0,90 |

### 5.3.6 Comparativo da fermentação em batelada alimentada com reciclo de células por *Spathaspora passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis*

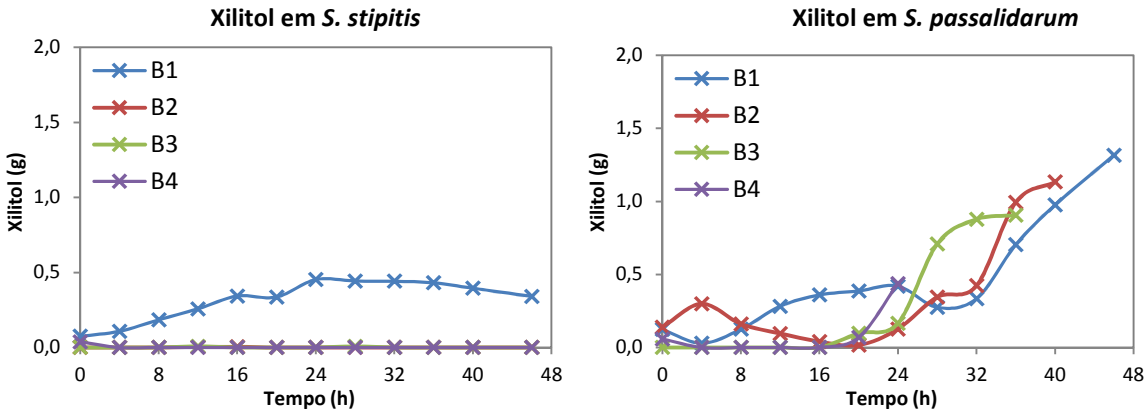
Ambas as leveduras testadas são eficientes na fermentação de pentoses e promissoras para o desenvolvimento de tecnologias para a produção do etanol 2G. Contudo, comparando os resultados de fermentação com *S. stipitis* e *S. passalidarum* para o hidrolisado obtido neste trabalho, com maior proporção de glicose que xilose, a levedura *S. passalidarum* apresentou melhores rendimentos e produtividade, por consumir simultaneamente pentose e hexose em menor tempo. A fermentação simultânea de glicose, xilose e celobiose é um desafio para a maioria dos microrganismos, pois a presença de glicose reprime a utilização de outros sacarídeos, contudo, Long *et al.* (2012) já demonstraram a capacidade da *S. passalidarum* em consumir simultaneamente glicose e xilose.

Outro grande desafio para a produção de etanol a partir de xilose por leveduras que fermentam pentoses está no controle do fornecimento de oxigênio para maximizar a produção de etanol. O excesso de oxigênio conduz a um crescimento celular aeróbio e um baixo rendimento em etanol; o fornecimento insuficiente de oxigênio diminui a taxa de fermentação, aumenta o acúmulo de xilitol e faz com que a produtividade em etanol seja pequena (SU *et al.*, 2015).

Esse controle é dificil de ser alcançado. Para fermentação com *S. stipitis*, feita com microaeração conforme metodologia descrita por Santos *et al*. (2015), ainda se observa crescimento celular e, para a fermentação por *S. passalidarum*, realizada sem microaeração, observa-se um acúmulo de xilitol, ainda que pequeno, maior que para a fermentação com *S. stipitis*.

A Figura 49 mostra a comparação da formação de xilitol nas 4 bateladas alimentadas para *S. stipitis* e *S. passalidarum*. *S. stipitis* acumulou 0,6 g/L de xilitol (correspondendo a um $Y_{Xilitol/S}$ de 0,01 g de xilitol/ g de substrato) na primeira batelada alimentada e quase zerou sua procução nas bateladas seguintes. *S. passalidarum* produziu 2,7 g/L de xilitol na primeira batelada alimentada (correspondendo a um $Y_{Xilitol/S}$ de 0,05 g de xilitol/ g de substrato ou 0,13 g de xilitol/ g de Etanol) e diminui a produção para 0,8 g/L na última batelada alimentada ($Y_{Xilitol/S}$ de 0,02 g de xilitol/ g de substrato ou 0,03 g de xilitol/g de Etanol).

**Figura 49**. Formação de xilitol por batelada para a fermentação com cada uma das leveduras.

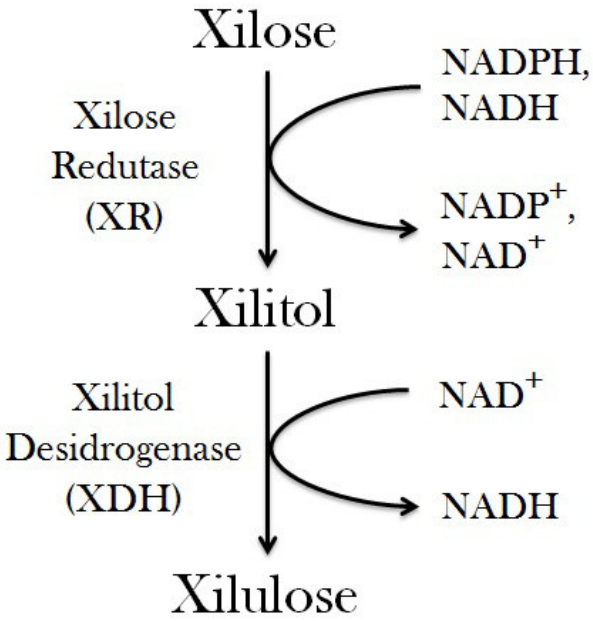



Fonte: Próprio autor.

A microaeração é necessária durante a fermentação de xilose, com precisão controlada, para regenerar o cofator $NAD^+$ requerido pela enzima xilitol desidrogenase (XDH) no metabolismo da xilose. Na maioria das leveduras capazes de fermentar xilose, a xilose é metabolizada por: (1) redução de xilose a xilitol pela xilose redutase (XR) e (2) oxidação de xilitol em xilulose pela xilitol desidrogenase (XDH) (Figura 50). Na sequencia, a xilulose entra na via das pentoses para ser convertida em gliceraldeído-3-P, sendo reduzido a etanol. A maioria das xilose redutases (XR) tem dupla especificidade, usando tanto NADPH quanto NADH como cofator, normalmente com preferência pelo NADPH. A maioria das xilitol desidrogenases (XDH) utilizam $NAD^+$ como cofactor. Se quantidades insuficientes de $NAD^+$ forem regeneradas, ocorre acúmulo de xilitol e bloqueio do metabolismo de xilose (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2007; SKOOG; HAHN-HAGERDAL, 1990).

Hou (2012) demostrou uma relação mais equilibrada de cofatores entre xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) para *S. passalidarum* que para *S. stipitis*. No seu trabalho, Hou demontrou que a xilose redutase (XR) em *S. passalidarum* tem preferência pelo cofator NADH. Portanto, o $NAD^+$ exigido pela xilitol desidrogenase (XDH) pode ser satisfeito pela reoxidação do NADH pela xilose redutase (XR) em *S. passalidarum*, sem necessidade de oxigênio extra. Hou (2012) apesar de demonstrar que a *Spathaspora passalidarum* desempenha alto rendimento em produção de etanol a partir de xilose, sob condições anaeróbias, relata que na presença de glicose misturada à xilose, o metabolismo da glicose interfere no metabolismo da xilose, sendo necessária a microaeração.

**Figura 50**. Metabolismo da xilose a xilulose mostrando cofatores envolvidos.

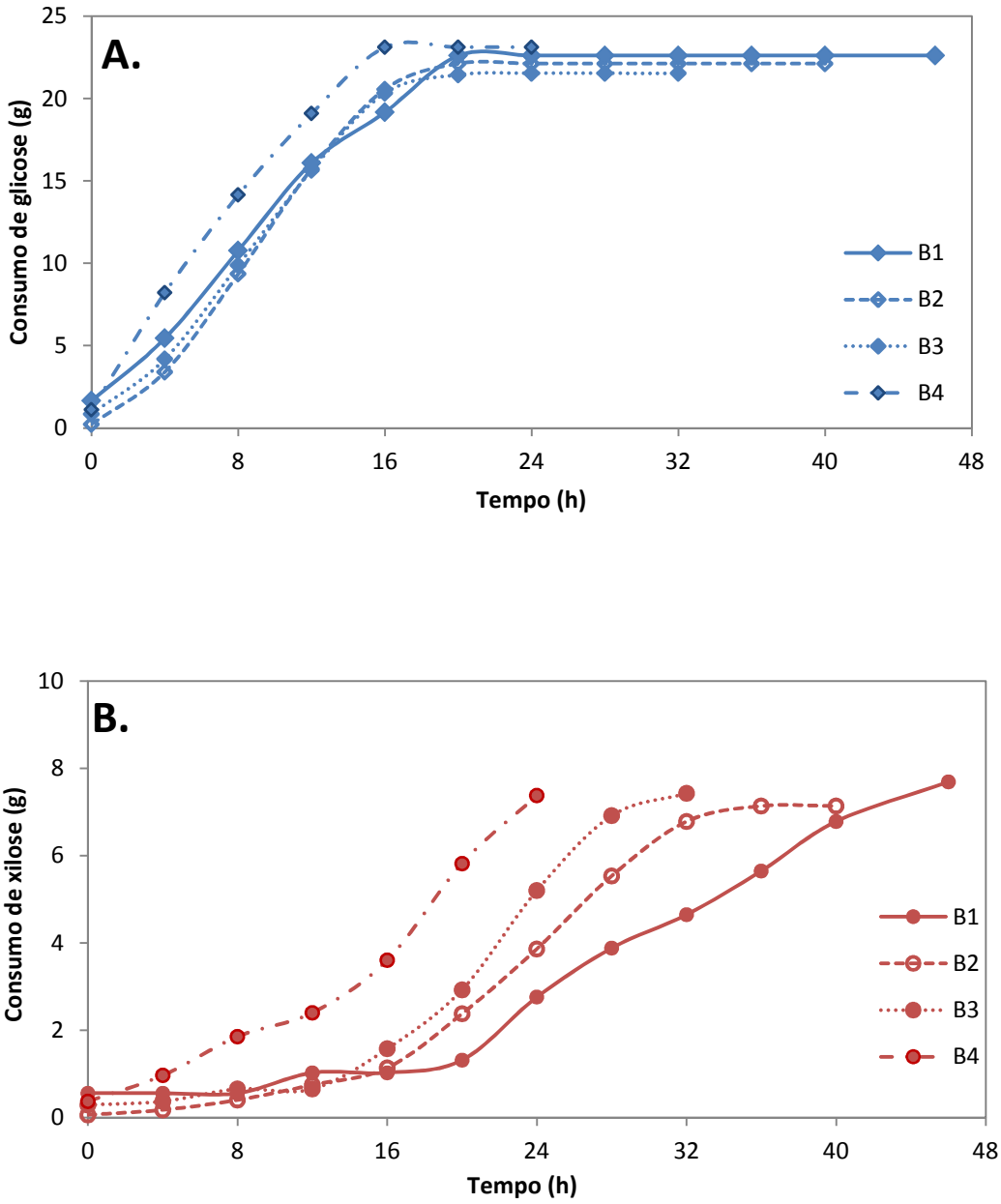



Fonte: Agbogbo e Coward-Kelly (2008) adaptado.

Os gráficos de consumo de carboidratos (glicose e xilose) e as velocidades de consumo de cada um por batelada para fermentação pelas duas leveduras são apresentados nas Figuras 51 a 54. É possivel observar a interferência da presença da glicose no consumo da xilose, para as duas leveduras e também se observa a diferença no perfil de consumo dos carboidratos por *S. passalidarum* e por *S. stipitis*.

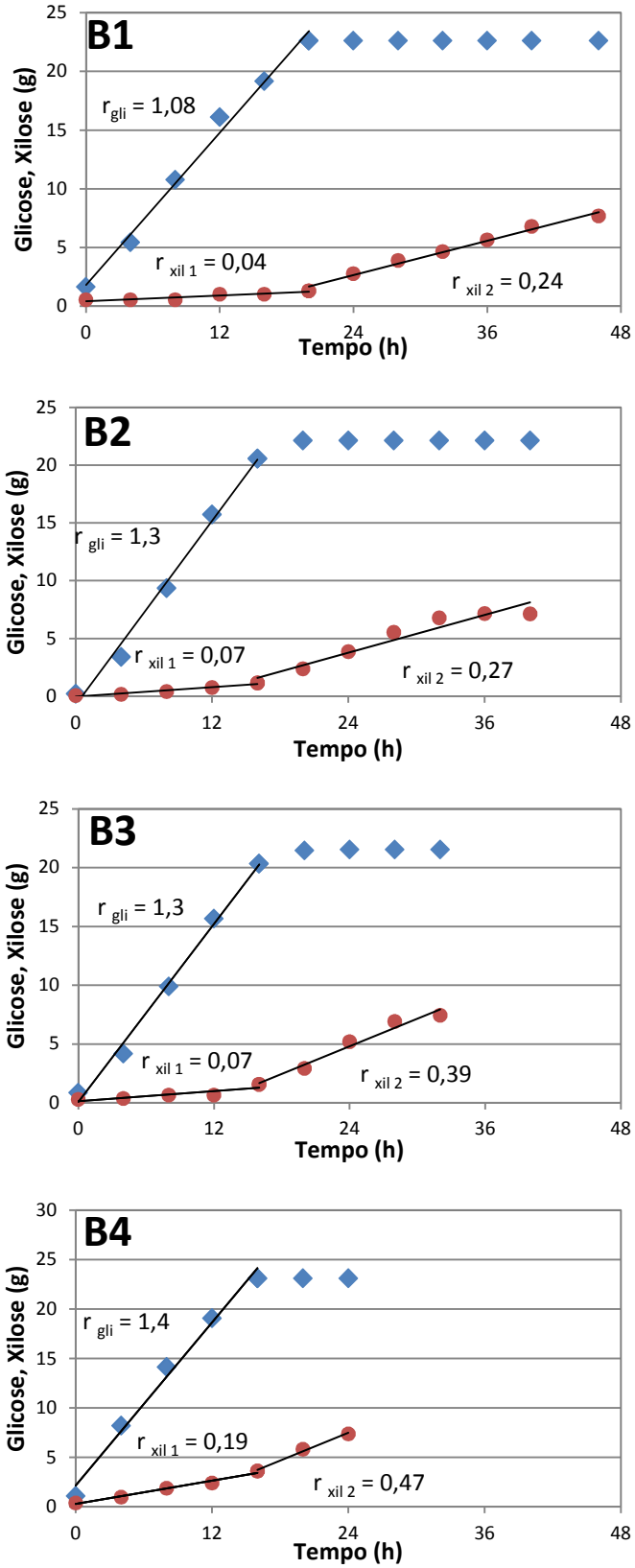
Observa-se pelas Figuras 51 e 52 um consumo linear de glicose pela *S. passalidarum*, sendo possível determinar a velocidade de consumo deste açúcar pela integração do consumo da glicose. A velocidade de consumo da glicose aumenta a cada batelada alimentada para *S. passalidarum*. No entanto, para as fermentações com *S. stipitis* o consumo da glicose não é linear (Figura 53). Essa levedura requer um tempo maior de adaptação da célula ao meio. Contudo, a cada batelada alimentada o tempo de consumo diminui, mostrando um consumo quase linear na quarta batelada.

**Figura 51**. Consumo de glicose (A) e xilose (B) em cada batelada alimentada para fermentação com *S. passalidarum*.




Fonte: Próprio autor.

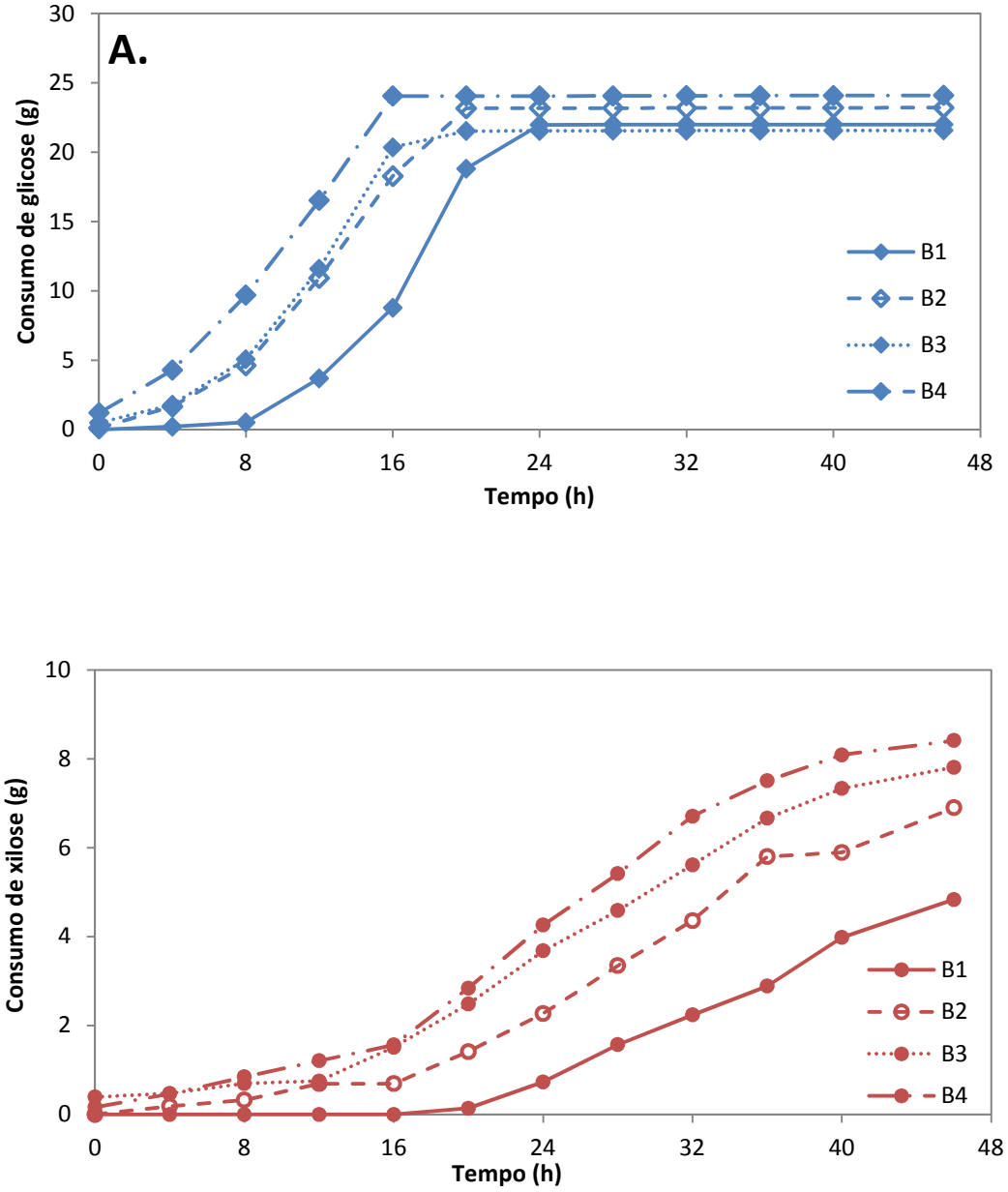
**Figura 52.** Velocidade de consumo de carboidratos por batelada para fermentação por *S. passalidarum*.




$R_{gli}$ - Velocidade de consumo de glicose (g/h); $R_{xil\ 1}$ - Velocidade de consumo de xilose na presença de glicose; $R_{xil\ 2}$ - Velocidade de consumo de xilose após exaustão de glicose.

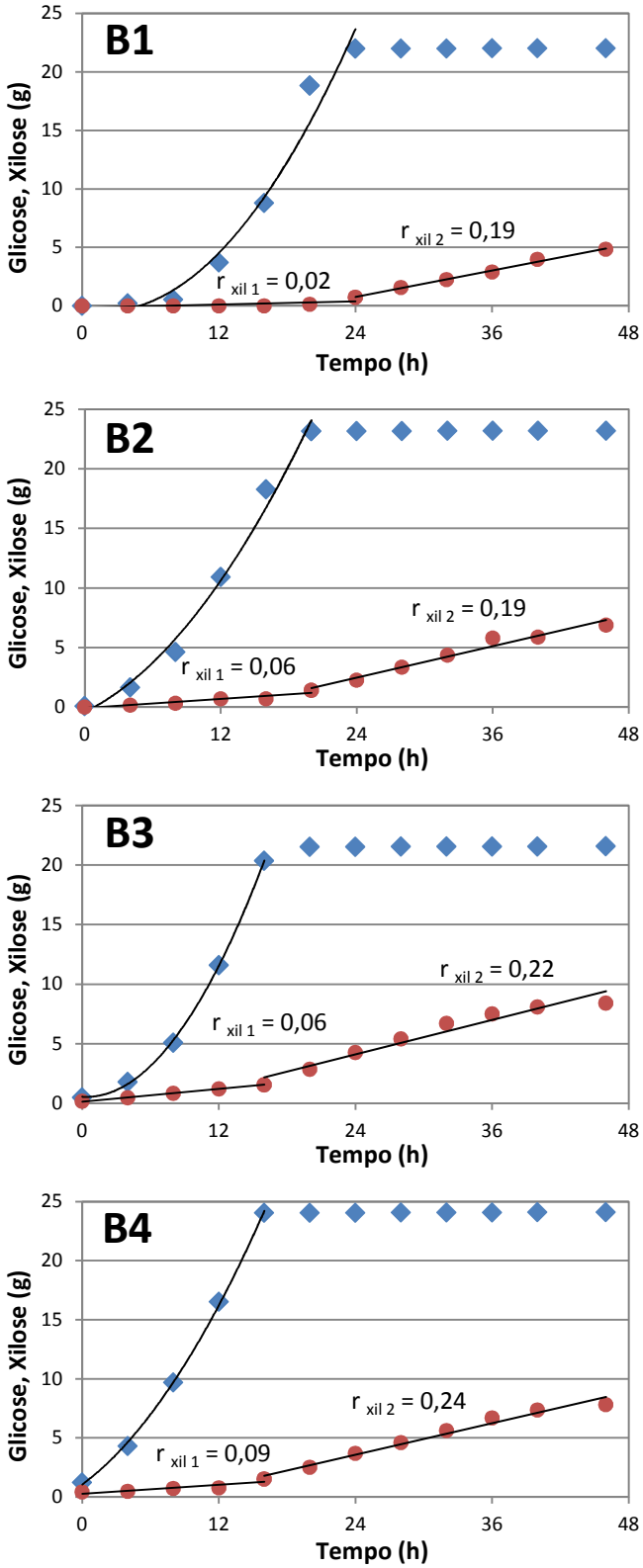
Fonte: Próprio autor.

**Figura 53**. Consumo de glicose (A) e xilose (B) em cada batelada alimentada para fermentação com *S. stipitis*.




Fonte: Próprio autor.

**Figura 54.** Velocidade de consumo de carboidratos por batelada para fermentação por *S. stipitis*.




$R_{xil\ 1}$ - Velocidade de consumo de xilose na presença de glicose; $R_{xil\ 2}$ - Velocidade de consumo de xilose após exaustão de glicose.

Fonte: Próprio autor.

Para o consumo da xilose duas fases de consumo são observadas para as duas leveduras (Figura 51 e Figura 53). A primeira, com menor velocidade, que coincide com a presença de glicose no meio. E a segunda, com maior velocidade, após o fim da disponibilidade de glicose no meio.

Para *S. passalidarum*, observa-se o consumo simultâneo da glicose e xilose desde a primeira batelada. A velocidade de consumo da xilose é mais baixa nas primeiras horas quando há glicose no meio, mas aumenta a cada batelada, com valores de 0,04 g/h na primeira batelada até 0,19 g/h na quarta batelada. No segundo estágio de consumo, com a exaustão da glicose no meio, a velocidade de consumo da xilose aumenta de 0,24 g/h na primeira batelada para 0,47 g/h no final da última batelada. Para *S. stipitis*, a velocidade inicial de consumo de xilose na apresença de glicose varia de 0,02 g/h na primeira batelada para o máximo de 0,09 g/h na quarta batelada. Já no segundo estágio de consumo, com a exaustão da glicose no meio, a velocidade de consumo de xilose varia de 0,19 g/h na primeira batelada para 0,24 g/h na quarta batelada, o que representa a metade da velocidade de consumo de xilose pela *S. passalidarum*.

Hou (2012) relata que a glicose reprime a atividade enzimática da xilose redutase (XR) e da xilitol desidrogenase (XDH) para as duas leveduras, mas a repressão da glicose na atividade destas enzimas se mostra menos pronunciada em *S. passalidarum* do que em *S. stipitis*. Os gráficos das Figuras 51 a 54 confirmam essa repressão da atividade dessas enzimas, afetando o consumo da xilose, sendo menos pronunciada em *S. passalidarum* do que em *S. stipitis*.

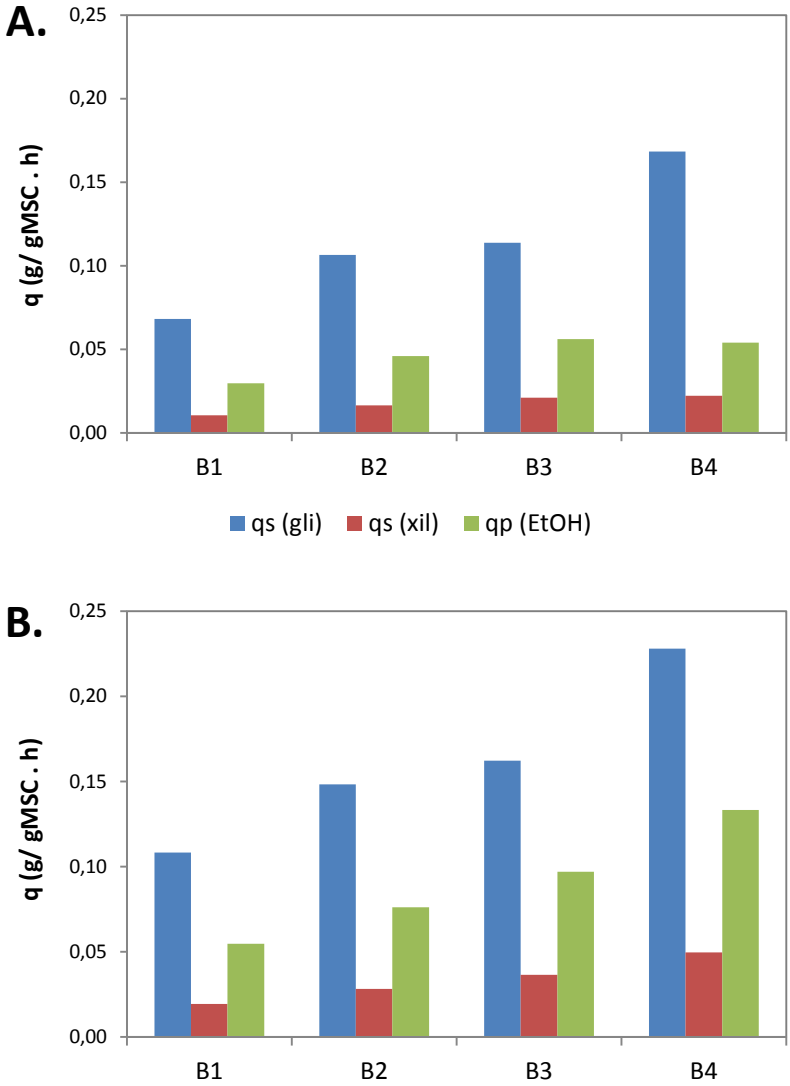
Pelo gráfico da Figura 54 também é possível verificar o que afirmou Santos *et al.* (2016), que o reciclo das células e a diminuição de 1°C na temperatura de fermentação contribuem para a assimilação de xilose pela *S. stipitis*, que na primeira batelada só consumiu a xilose após consumir a glicose, e nas bateladas seguintes, ainda que com uma velocidade baixa, consumiu a xilose juntamente com a glicose disponível. Esta estratégia também é efetiva para *S. Passalidarum* (Figura 52).

Observa-se melhor desempenho para as duas leveduras a 27°C (quarta batelada alimentada). Um *review* de fermentação de xilose a etanol do NREL (McMILLAN, 1993) também relata a forte relação entre a temperatura de processo e a taxa de crescimento e a toxidade do etanol para microrganismos fermentadores de xilose (*C. shehatae* e *P. stipitis*). Experimentos com reciclo fixando a temperatura a 27°C devem ser realizados para verificar se o efeito na melhora do desempenho ocorre pela temperatura, pelo reciclo ou pela combinação dos fatores. Análises de transcriptomica podem ajudar a explicar o que

ocorre. Acredita-se que os dois efeitos influenciem na eficiência fermentativa, mas o efeito da temperatura parece ser mais marcado.

A velocidade específica de consumo dos açúcares (qs) e a velocidade específica de produção de etanol (qp) também foram calculadas considerando a massa (base seca) de células na fermentação. As velocidades específicas reportadas na Figura 55 são as velocidades nos tempo em que há máximo consumo ou produção.

**Figura 55**. Velocidade específica de consumo de glicose [qs (gli)], velocidade específica de consumo de xilose [qs (xil)] e velocidade específica de produção de etanol [qp (EtOH)] (em g/gMSC.h) para *S. stipitis* (**A**) e *S. passalidarum* (**B**).

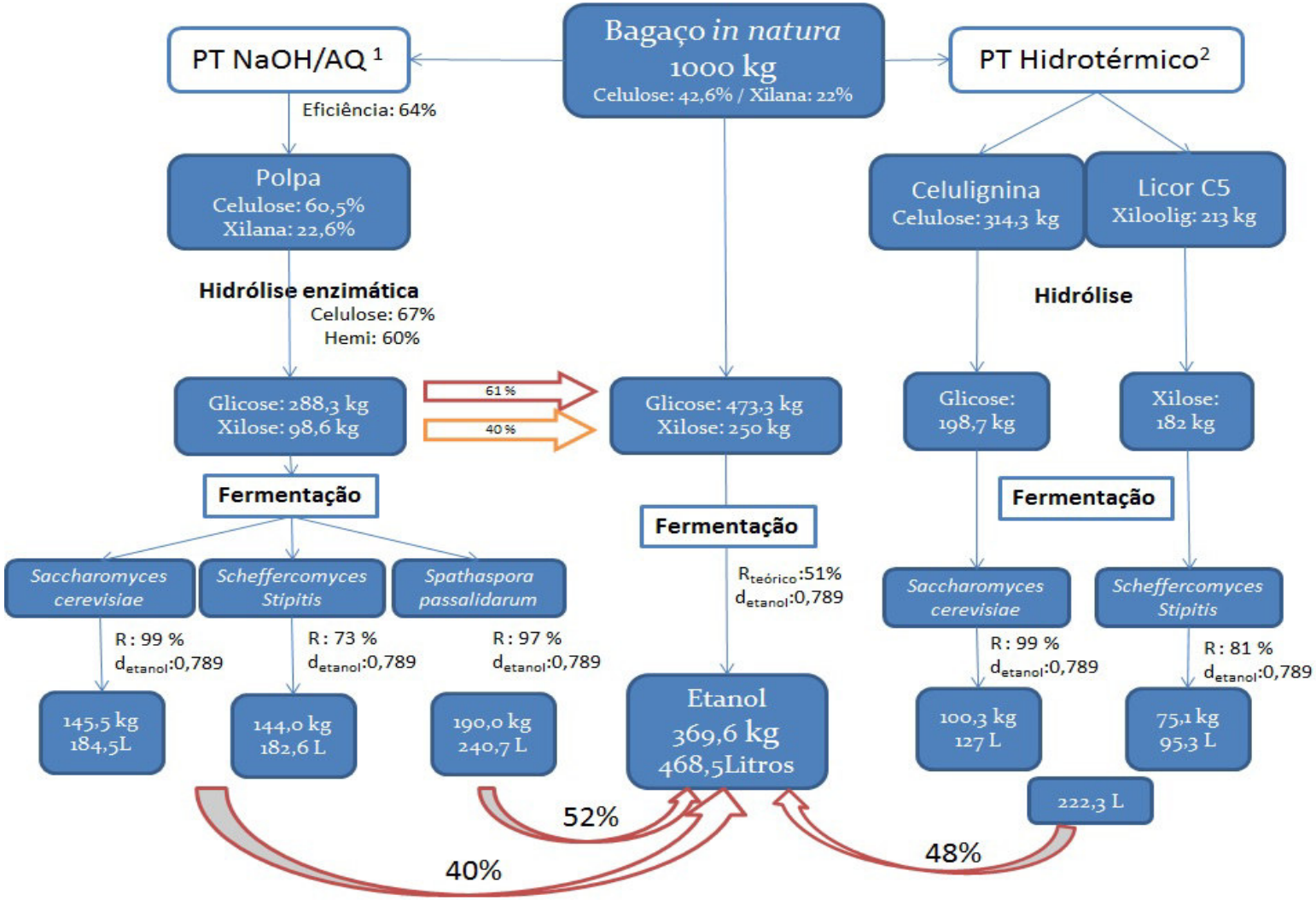



Fonte: Próprio autor.

Nesta estratégia utilizada de elevada concentração de glicose em relação à xilose a *S. passalidarum* teve melhor desempenho do que *S. stipitis*, apresentando uma velocidade específica de consumo de xilose de 0,05g/gMSC.h e velocidade específica de produção de etanol de 0,13g/gMSC.h, ambas 2,5 vezes maior que as velocidades para *S. stipitis*.

Finalmente, em uma comparação simples, considerando apenas rendimento de reações, e comparando a um valor teórico de etanol produzido se todo açúcar presente na celulose e hemicelulose do bagaço fosse transformada em etanol com 100% de rendimento (Figura 56), com o processo proposto neste trabalho (utilizando um pré-tratamento alcalino com antraquinona nas condições do Ens 5 Pil/AQ, e a *S. passalidarum* para fermentação simultânea de pentose e hexose) seria possível obter 241 L de etanol por tonelada de bagaço (base seca) que corresponde a 52% do etanol teórico. Se fosse utilizado o mesmo pré-tratamento e as mesmas condições de hidrólise, porém a fermentação com *S. cerevisiae*, fermentando apenas a fração C6, seria possível obter apenas 40% do etanol teórico. Considerando ainda, o mesmo pré-tratamento e condições de hidrólise, porém com a fermentação utilizando *S. stipitis*, que tem menor rendimento, para fermentação de C5 e C6, também seria possível obter apenas 40% do etanol teórico (183 L de etanol por tonelada de bagaço). Considerando dados da literatura (SILVA *et al*., 2011) de um pré-tratamento hidrotérmico (rendimento mássico - 52%; teor de celulose na celulignina - 61%; deslignificação e hidrólise da fração celulósica com 82% de eficiência; xilooligossacarídeos no licor - 82%); considerando a fermentação da fração celulósica por *S. cerevisiae* com 99% de eficiência e, baseado na fermentação de C5 usando *S. stipitis* com eficiência de 81% (SANTOS *et al.*, 2015) seria possível obter 222 L de etanol/ tonelada de cana, que corresponde a 48 % do teórico.

**Figura 56**. Fluxograma de comparação da obtenção de etanol por diferentes rotas.




Fonte: Próprio autor.

Lau e Dale em 2009 relataram um balanço de massa completo da produção de etanol a partir da palha de milho, pré-tratada por AFEX e fermentada por uma levedura modificada, *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) capaz de fermentar a xilose. Nesse estudo, Lau e Dale alcançaram um rendimento de etanol de 191,5 g de etanol/ kg de palha de milho, equivalentes a 242,7 L/ tonelada de palha de milho.

Também em 2009, num livro publicado pelo Centro de Gestão e Estudos Estratégicos da Unicamp (NIPE/ Unicamp) intitulado "Bioetanol combustível, uma oportunidade para o Brasil", os autores relataram que no estágio tecnológico da época, com pré-tratamento e hidrólise ácida diluída, com aproveitamento das hexoses, seria possível produzir 69,1 litros de bioetanol por tonelada de bagaço *in natura*; num cenário mais otimista de desenvolvimento tecnológico, com pré-tratamento e hidrólise enzimática, e aproveitamento das hexoses e pentoses, com a tecnologia otimizada, estimava-se produzir 149,3 litros de bioetanol por tonelada de bagaço de cana *in natura*.

No relatório do BNDES de 2015 (MILANEZ *et al.*, 2015) baseado em premissas discutidas com diversas empresas e especialistas, foram apresentas estimativas sobre o potencial de melhoria de eficiência e redução de custos de produção do E2G em diferentes cenários tecnológicos. Neste relatório foram propostos três patamares de produção de E2G coincidentes com os horizontes temporais, sendo definidos (em L/ tonelada de material lignocelulósico seco), para o curto prazo, em torno de 240; para o médio, cerca de 300; e, para o longo prazo, próximo a 350. Esses valores foram determinados considerando os avanços tecnológicos para o processo 2G, tais como aumento de rendimentos nas etapas de conversão e maior recuperação de produto nas etapas de separação sólido-líquido. Além disso, estes cenários consideraram o uso de organismos geneticamente modificados.

O processo proposto neste trabalho, com um único pré-tratamento e a cofermentação de xilose e glicose sem o uso de organismos geneticamente modificados, pode ser considerado eficiente e dentro do esperado para o curto prazo, estimando-se alcançar 247 L/ ton de bagaço seco, mostrando-se como uma potencial estratégia na produção de etanol de segunda geração.

## 5.4 Avaliação da viabilidade técnica industrial preliminar do processo de obtenção de etanol 2G.

Uma avaliação da viabilidade técnica industrial do processo proposto neste trabalho para obtenção de etanol 2G foi realizada mostrando uma comparação técnica entre o cenário deste projeto e o cenário 1G2G Curto-prazo do relatório do BNDES apresentado por Milanez et al. (2015), além de sinalizar os principais gargalos tecnológicos para a implantação do processo em escala industrial para uma posterior análise econômica.

A presente avaliação é baseada nos dados experimentais do processo desenvolvido ao longo deste projeto, e refere-se a uma primeira análise destes dados considerando sua aplicação em escala industrial. Os dados para a análise de viabilidade técnica do processo englobam os dados experimentais do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar realizado na condição otimizada (130°C, 30min, 1,5% NaOH m/v, 0,15% m/m antraquinona), da hidrólise enzimática do material pré-tratado com razão sólido:líquido 1:10, empregando a enzima comercial Celluclast 1.5 L com carga enzimática de 15FPU, suplementada pela β-glicosidase (Novozym 188) com carga enzimática de 20UI; e os dados da etapa de fermentação do hidrolisado dos ensaios realizados com a levedura *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 para produção de etanol de segunda geração (2G).

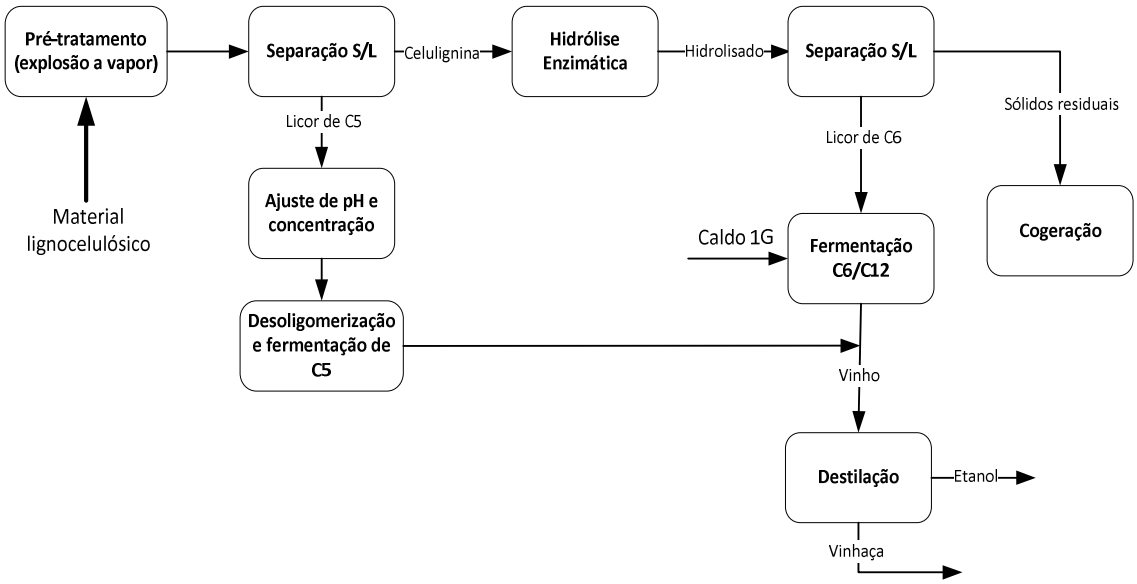
Considerou-se também uma etapa subsequente ao pré-tratamento na qual é feita a precipitação da lignina, por intermédio da acidificação do meio, para posterior obtenção de produtos de alto valor agregado.

Com auxílio de uma ferramenta de simulação computacional, foram calculados os balanços de massa e energia deste processo 2G integrado a uma unidade de produção de etanol de primeira geração (1G).

Vale ressaltar que, assim como as usinas 1G existentes, considera-se que as unidades 1G2G avaliadas devem ser autossuficientes em energia, utilizando parte do material lignocelulósico (bagaço e palha) e os sólidos residuais, como combustível para geração de vapor e eletricidade. Portanto, a disponibilidade de material lignocelulósico para o processo 2G é resultante do balanço de massa e energia da planta e dependente do consumo energético do processo.

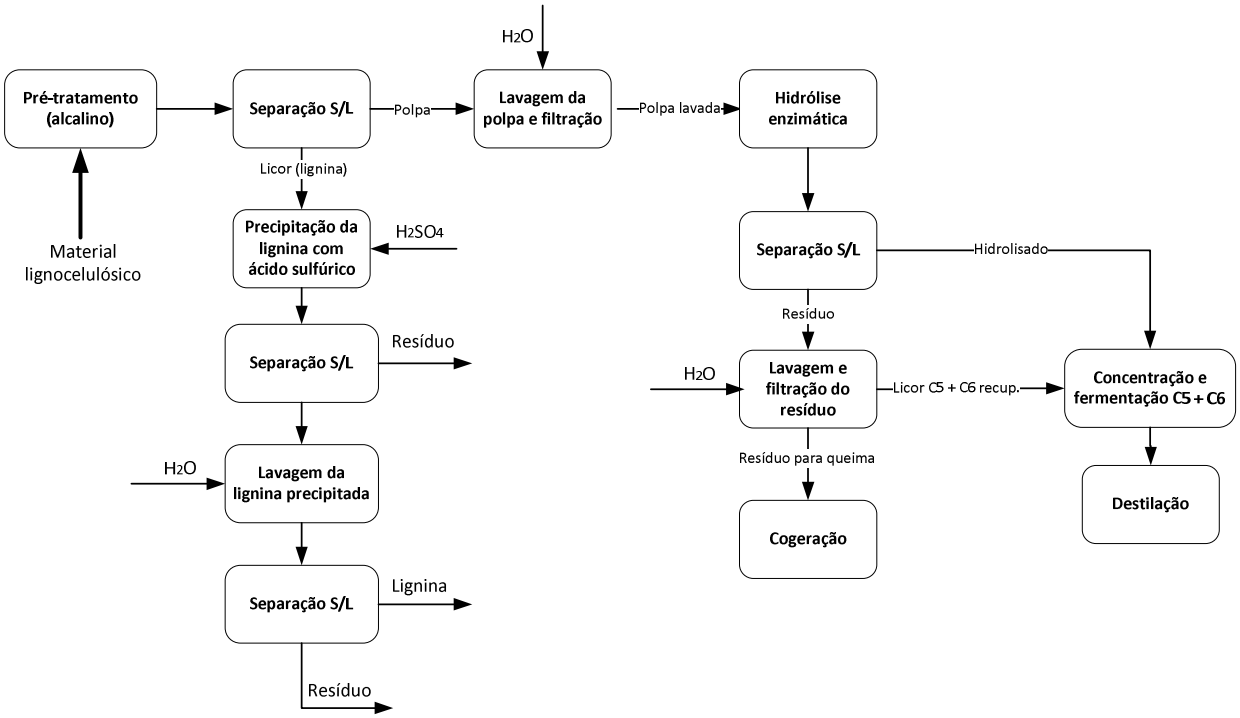
As Figuras 57 e 58 mostram os fluxogramas dos processos 2G Curto-prazo BNDES (MILANEZ *et al.*, 2015) e 2G deste trabalho, respectivamente. Os principais parâmetros utilizados para a construção dos dois cenários são mostrados na Tabela 25.

**Figura 57.** Fluxograma resumido do setor 2G para o processo 2G Curto-prazo.




Fonte: (MILANEZ *et al.*, 2015).

**Figura 58.** Fluxograma resumido do setor 2G para o processo proposto neste trabalho.




Fonte: Próprio autor.

**Tabela 25.** Parâmetros utilizados para a construção das simulações - cenários 1G2G Curto-Prazo BNDES (MILANEZ *et al.*, 2015) e 2G deste trabalho.

| Parâmetro | 1G2G Curto-prazo BNDES | Processo 2G para este trabalho |
|---|---|---|
| **Pré-tratamento** | | |
| Tipo | Explosão a vapor | Alcalino |
| Temperatura (°C) | 190 | 130 |
| Tempo de residência (min) | 15 | 30 |
| **Aditivos** | -------- | Antraquinona 0,15% m/m |
| Teor de sólidos (%) | * | *Razão sólido: líquido 1:15* |
| Conversão de celulose a oligômeros de glicose (%) | 0,5% | 9,16% |
| Conversão de xilana a xilose (%) | 30% | - |
| Conversão da xilana a oligômeros de xilose (%) | 30% | 35,1% |
| Degradação de xilana a furfural (%) | 10% | - |
| Solubilização da lignina (%) | 10% | 73,7% |
| Conversão arabinana a arabinose (%) | - | 48% |
| **Hidrólise Enzimática** | | |
| Temperatura (°C) | 50 | 50 |
| Tempo de residência (h) | 48 | 72 |
| Teor de sólidos (%) | 15 | *Razão sólido: líquido 1:10* |
| Conversão de celulose a glicose (%) | 60% | 67,1% |
| Conversão de xilana a xilose (%) | 60% | 58,8% |
| **Quebra de oligômeros e fermentação de C5 (para Vale, C5 + C6)** | | |
| Tempo de residência (h) | 48 | 24 |
| Conversão de oligômeros a açúcares monoméricos (%) | 80% | - |
| Conversão de C6 a etanol (%) | 90% | 97,2% |
| Conversão de C5 a etanol (%) | 80% | 88,2% |
| **Fermentação de C6/C12** | | |
| Condições operacionais | Iguais a 1G | - |
| Conversão de C6/C12 a etanol (%) | 88 | - |

* *Definida pela demanda de vapor para atingir a temperatura do reator*

A Tabela 26 mostra os principais resultados para ambos cenários. Alguns desses resultados foram selecionados por serem geradores de receita da planta (produção de etanol e excedente de eletricidade) e outros por serem de grande relevância para a análise da viabilidade técnica do projeto (consumo energético em diferentes operações como destilação e concentração do caldo).

**Tabela 26.** Comparação de resultados de simulação do processo 2G deste trabalho e cenário 1G2G Curto-prazo.

| Resultados | 1G2G Curto-prazo BNDES | Este trabalho | Desvio |
|---|---|---|---|
| Material processado 2G (BU) (kg/h) | 164,148 | 109,293 | -33,42% |
| Material processado 2G (BS) (kg/h) | 90,147 | 60,004 | -33,44% |
| Produção de etanol 1G (L/h) | 69,118 | 69,820 | 1,02% |
| Produção de etanol 2G (L/h) | 21,269 | 13,511 | -36,48% |
| Produção de etanol total (L/h) | 90,388 | 83,331 | -7,81% |
| Rendimento 2G (L etanol anidro/ ton LCM BS processado) | 236 | 225 | -4,57% |
| Consumo de eletricidade (kW) | 30,224 | 29,044 | -3,91% |
| Excedente de eletricidade (kW) | 57,154 | 59,584 | 4,25% |
| Consumo de vapor no pré-tratamento (2G) (kg/h) | 39,903 | 134,150 | 236,19% |
| Consumo de vapor na concentração do licor (2G) (kg/h) | 24,040 | 87,196 | 262,71% |
| Consumo de vapor na concentração do caldo (1G) (kg/h) | 378,737 | 276,525 | -26,99% |
| Consumo de vapor evaporação total (1G + 2G) (kg/h) | 402,777 | 363,721 | -9,70% |
| Consumo de vapor na destilação (1G + 2G) (kg/h) | 281,312 | 308,260 | 9,58% |
| Consumo de hidróxido de sódio (kg/h) | - | 13,540 | - |
| Consumo de ácido sulfúrico (kg/h) | - | 10,248 | - |

* BS = Base seca; BU = Base úmida; LCM = material lignocelulósico

A produção de etanol total do cenário 2G deste trabalho foi inferior à do cenário 2G Curto-prazo BNDES, apesar de os rendimentos 2G de ambos os cenários serem próximos. É possível observar pela comparação dos resultados obtidos que a quantidade de material lignocelulósico processado pela planta 2G do Cenário 2G deste trabalho é bastante inferior à processada pela planta 2G do cenário 1G2G Curto-prazo. Este fator está intimamente relacionado à quantidade de bagaço disponível para a produção de etanol 2G, visto que é dependente do balanço energético da planta toda, e, portanto, processos que apresentem um maior consumo de energia térmica (vapor), terão menor quantidade de material para a produção de etanol de segunda geração.

Salienta-se que ao contrário do 2G Curto-prazo, o cenário 2G deste trabalho não levou em consideração a queima da lignina para a geração de vapor em complementação a geração disponível pela queima da palha e do resíduo da hidrolise enzimática, o que resulta em uma diferença significativa de poder calorifico para cogeração de energia.

Considerando-se que é possível recuperar em torno de 1,7kg de lignina a cada 10kg de bagaço processado e que o poder calorífico inferior da lignina é de 16.219 kJ/kg (50% umidade), em cálculos estimativos tem-se que a queima resultaria em 27.572 kJ.

No entanto, a queima desse material não foi considerada nesta análise uma vez que, dado o processo custoso de precipitação e recuperação da mesma, há planos para um melhor aproveitamento da lignina, incluindo estudos futuros sobre possíveis usos para a obtenção de outros derivados químicos com maior valor agregado.

A diversificação dos produtos que podem ser advindos do processamento da biomassa lignocelulosica para a obtenção do etanol de segunda geração apresenta-se como fator de extrema importância para prover a viabilidade econômica do processo. E isso pode ser obtido por meio da venda de coprodutos e resíduos para outros processos (STEPHEN et al, 2012).

Através da comparação dos resultados apresentados na Tabela 26 observa-se que o consumo de vapor do processo 2G dete trabalho para as etapas de concentração do caldo para etanol 2G, destilação e pré-tratamento é maior do que os valores encontrados para o processo 1G2G Curto-prazo. É importante comentar que o processo 1G2G Curto-prazo difere do processo 2G deste trabalho quanto à concentração do licor (2G), pois no primeiro caso apenas o licor contendo açúcares C5 é concentrado na planta 2G, sendo o licor de açúcares C6 misturado ao caldo de cana-de-açúcar e concentrado no setor 1G da planta. No processo 2G deste trabalho, o hidrolisado enviado para a fermentação 2G possui açúcares C5 e C6, e não há separação prévia. Sendo assim, a comparação de consumo de vapor para a concentração deve ser realizada sobre o consumo total de vapor (1G + 2G); desta forma, para essa operação o consumo de vapor para o cenário 2G deste trabalho é mais baixo, pois a fermentação 2G ocorre em meio mais diluído (com concentração de açúcares mais baixa).

A análise dos resultados obtidos permite afirmar que o processo para produção de etanol de segunda geração proposto neste projeto apresenta-se promissor visto que atinge resultados satisfatórios de produção de etanol sem a utilização de microrganismos geneticamente modificados.

Assim como toda tecnologia emergente este apresenta gargalos tecnológicos que devem ser aprimorados. Um dos pontos passíveis de otimização é o teor alcoólico do vinho produzido na fermentação de C5/C6 do processo, tendo 2,4% em massa de teor alcóolico, sendo muito diluído visto que em processos de fermentação 1G o teor de etanol mássico no vinho costuma estar entre 6% e 8%. Esta diluição impacta em termos de consumo

energético na destilação e também no custo de equipamentos, requerendo maiores volumes de fermentação. Entretanto por se tratar de um processo fermentativo com um microrganismo ainda pouco reportado na literatura, tem-se que um maior teor alcoólico do vinho é passível de ser obtido, e o tempo de fermentação mais curto apresenta-se como uma vantagem de alto interesse industrial.

O processo de pré-tratamento do material lignocelulósico foi realizado em uma razão sólido liquido de 1:15, o resultou em uma maior demanda de vapor quando comparada a do cenário 1G2G Curto-prazo. O pré-tratamento mais diluído foi realizado no projeto devido a gargalos técnicos de agitação do reator, fator esse que foi sanado após alteração da disposição e altura das pás do agitador de 350L.

Um ponto positivo a ser destacado pelo processo 2G proposto neste trabalho é a alta eficiência de conversão de açúcares C5 e C6 a etanol apresentada pela levedura *Spathaspora passalidarum*. Como apresentado no item 5.3.5, a produção de etanol considerando açúcares C5 + C6 foi de 0,489 g etanol/g açúcares, enquanto o rendimento teórico é de 0,511 g etanol/ g açúcares. O tempo de fermentação para a quarta batelada foi de 24 horas, o que também é vantajoso comparado a outros processos de fermentação de açúcares C5, uma vez que grande parte destes apresenta tempos de fermentação mais longos. Por exemplo, no cenário 1G2G Curto-prazo, considerou-se um tempo de fermentação de 48 horas.

Outra vantagem do processo proposto é que, devido ao fato do pré-tratamento 2G proposto remover os grupos acetis da biomassa, resulta em um hidrolisado que pode ser direcionando diretamente para o processo fermentativo, sem a necessidade prévia de desoligomerização e destoxificação.

# 6 Conclusões

Sendo o principal objetivo deste trabalho contribuir para desenvolvimento da tecnologia para o etanol de segunda geração através do estudo da ampliação de escala do processo de pré-tratamento alcalino do bagaço de cana-de-açúcar, pôde-se inferir:

- A ampliação de escala mostrou uma boa reprodutibilidade dos dados, considerando o sistema de aquecimento e agitação mais eficientes na escala piloto em relação à escala de laboratório.
- A antraquinona pode ser aplicada no pré-tratamento alcalino do bagaço de cana visando à produção de etanol de segunda geração, em condições amenas de temperatura visto que, em reações de elevadas temperaturas, a antraquinona influencia negativamente na posterior conversão enzimática da celulose.
- A melhor condição de pré-tratamento (130°C, 30 min, 1,5% m/v NaOH, 0,15% m/m antraquinona), dentre as avaliadas, pode gerar 293 kg de glicose e 94 kg de xilose a partir de uma tonelada de bagaço de cana (extrapolando os resultados piloto), que podem ser usados na geração de etanol por meio de fermentação.
- As estratégias de fermentação empregadas neste estudo favoreceram o consumo de xilose aumentando a produção de etanol. As estratégias de processo aumentaram a produtividade volumétrica de 0,39 para 0,43 g/L.h (da primeira para a quarta batelada) com *S. stipitis* e de 0,47 para 0,90 g/L.h, reduzindo o tempo necessário para o consumo total de xilose de 40 para 24 h com *S. passalidarum*.
- O processo proposto neste trabalho, com um único pré-tratamento, hidrólise enzimática e cofermentação de xilose e glicose utilizando *S. passalidarum*, apresenta-se como uma estratégia promissora na produção de etanol de segunda geração, estimando-se alcançar 241 L/ ton de bagaço seco.
- A lignina obtida do processamento alcalino pode ser aproveitada para a obtenção de derivados químicos com maior valor agregado, provendo a viabilidade econômica do processo. As ligninas obtidas pelo pré-tratamento alcalino sofrem pouca oxidação estrutural e possuem poder calorífico entre 22,8 e 25,3 MJ/kg.

## Sugestões para trabalhos futuros

Para melhor aproveitamento das frações, tanto celulósica quanto hemicelulósica da biomassa, visando maior rendimento em açúcares monoméricos para a fermentação é importante o estudo e a otimização da etapa de sacarificação.

A otimização de processos fermentativos encontra-se com um dos principais objetos de estudos da área de biotecnologia. Como visto na análise de viabilidade técnica do processo, a baixa concentração de etanol no vinho gerado é um limitante do processo. Assim, o estudo da fermentação de concentrações mais elevadas de açúcares para a obtenção de vinhos com concentrações viáveis de etanol também é uma sugestão.

Ferramentas computacionais de análise e o acompanhamento das vias de fluxo metabólico dos microrganismos fermentadores também são de extrema valia para a otimização dos processos fermentativos. Desse modo, outra sugestão de trabalho seria o estudo das mudanças no perfil de metabolitos e expressão de enzimas causadas por estratégias fermentativas para, através dessas respostas, propor modificações no processo para aumentar a taxa de consumo de açúcares e a produtividade em etanol.

A lignina é um subproduto formado em grande quantidade no processo alcalino e sua utilização para obtenção de produtos de maior valor agregado ajudaria a tornar o processo economicamente viável. Assim, propõem-se estudos para melhor aproveitamento da lignina, com possíveis usos para a obtenção de derivados químicos com maior valor agregado, dentro da química fina e química verde.

**Referências**

AGARWAL, U.P., REINER, R.S., RALPH, S.A. Cellulose I crystallinity determination using FT–Raman spectroscopy: univariate and multivariate methods**. Cellulose**, v. 17, n. 4, p. 721–733, 2010.

AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipites*. **Biotechnology Letters**. v. 30, n. 9, p. 1515-1524. 2008.

AGBOR, V.B. *et al.* Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675-685, 2011.

AKERHOLM, M., HINTERSTOISSERB, B., SALMÉN, L. Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 569–578, 2004.

ANDRADE, R.R. *et al.* Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 351–359, 2013.

AZADI, P. *et al.* Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** v. 21, p. 506–523, 2013.

BADINO JR, A.C.; SCHMIDELL, W. Ampliação de escala. In: BIOTECNOLOGIA Industrial. São Paulo, SP: Edgard Blucher, 2001. Cap.15, v. 2.

BANERJEE, G. *et al.* Scale-Up and integration of alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanolic fermentation. **Biotechnology and Bioengineering.** v. 109, n. 4, p. 922-931, 2012.

BASSO, L.C. *et al.* Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res**. v. 8, n. 7, p.1155-1163, 2008.

BAUMHARDT NETO, R. Raios X. In: TÉCNICAS de caracterização de polímeros. São Paulo, SP: Artliber, 2007, p. 41-60.

BEECHER, J. F.; HUNT, C. G.; ZHU, J. Y. Tools for the characterization of biomass at the nanometer scale. In: THE NANOSCIENCE and technology of renewable biomaterials (eds L. A. Lucia and O. J. Rojas), Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009.

BEHERA, S. *et al.* Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.36, p. 91–106, 2014.

BERGGREN, R. *et al.* Alkaline degradation of birch and spruce: Influence of degradation conditions on molecular mass distributions and fibre strength. **Carbohydrate Polymers**, v.51, p.255–264, 2003.

BERLIN, A., GILKES, N., KILBURN, D. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates-evidence for the role of accessory enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 175-184, 2005.

BERLIN, A. *et al.* Inhibition of cellulase, xylanase, and β-glucosidase activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 198-209, 2006.

BIOETANOL combustível: uma oportunidade para o Brasil. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2009. ISBN - 978-85-60755-15-8.

BHAT, M.K.; HAZLEWOOD, G.P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: BEDFORD, M.R.; PARTRIDGE, G.G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxfordshire, UK: CAB International, 2001.

BRAND, M. A. **Energia de biomassa florestal**. Rio de Janeiro: Interciência, 2010. 131p.

BRASIL. MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balanço Energético Nacional 2016**: Ano base 2015 – RIO DE JANEIRO: EPE, 2016.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v.101, n. 13, 2010.

BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A.M.F. Enzymology of the thermofilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology Reviews**, v. 22, p. 120-130, 2009.

BUDDADEE, B. *et al.* The Development of multi-objective optimization model for excess bagasse utilization: A Case Study for Thailand. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 25, p. 380-391, 2008.

BURKHARDT, S.J. **Forest residues as a potential feedstock for a biorefinery**: material balance and pretreatment strategies. 2010. Thesis (Master of Applied Science) – Faculty of Graduate and Postdoctoral studies (Forestry), University of British Columbia. (Vancouver)

BURKHARDT, S. *et al.* How effective are traditional methods of compositional analysis in providing an accurate material balance for a range of softwood derived residues? **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 90, 2013.

CANILHA, L. *et al.* Giulietti, M.. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 84-92, 2010.

CARVALHO, W. *et al.* Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, p. 2191-2195, 2009.

CASTRO, A.M.; PEREIRA Jr, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**. v.33, n.1. 2010.

CHANG, V.; HOLTZAPPLE, M. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p. 5-37, 2000.

CHEN, F.; DIXON, R.A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 759-761, 2007.

CIOLACU, D., CIOLACU, F., POPA, V.I. Amorphous cellulose – structure and Characterization. **Cellulose Chemical Technology**, v.45, n. 1-2, p.13-21, 2011.

CORRALES, R.C.N.R. *et al.* Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of CO2 and SO2. **Biotechnology for Biofuels**. v. 5, p.36, 2012.

CRC Handbook of Chemistry and Physics. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. *Internet Version 2005,* Disponível em: http://www.hbcpnetbase.com

CRESTINI C.; ARGYROPOULOS, D.S. Structural Analysis of Wheat Straw Lignin by Quantitative $^{31}$P and 2D NMR Spectroscopy. The Occurrence of Ester Bonds and β-O-4 Substructures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 45, p. 1212-1219, 1997.

DAVIES, G.; HERISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, p. 853-859, 1995.

DEMIRBAS, A. Relationships between lignin contents and heating values of biomass. **Energy Conversion and Management**. v. 42, n. 2, p. 183-188, 2001.

DENIZ, I.; IMAMOGLU, E.; SUKAN, FV. Evaluation of scale-up parameters of bioethanol production from *Escherichia coli* KO11. **Turk J Biochem**. v. 40, n. 1, p. 74-80, 2015.

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

DIAS, O.S.M. *et al*. Production of bioethanol and other biobased materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical engineering research and design**, v. 87, p. 1206–1216, 2009.

Domínguez, J.M.O. **Efecto de los produtos de degradación originados em la explosión por vapor de biomassa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus**. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2003.

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

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. GCB Bioenergy, [S. l.], v. 1, p. 2–17, 2009.

DRIEMEIER, C.; BRAGATTO, J. Crystallite width determines monolayer hydration across a wide spectrum of celluloses isolated from plants. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, p. 415−421, 2013.

DRIEMEIER, C.; MENDES, F.M.; OLIVEIRA, M.M. Dynamic vapor sorption and thermoporometry to probe water in celluloses. **Cellulose**, v. 19, p. 1051-1063, 2012.

DRIEMEIER, C., CALLIGARIS, G.A. Theoretical and experimental developments for accurate determination of crystallinity of cellulose I materials. **Journal of Applied Crystallography**, v. 44, p. 184−192, 2011.

DRIEMEIER, C. *et al.* Evolution of cellulose crystals during prehydrolysis and soda delignification of sugarcane lignocellulose. **Cellulose**, v.18, p. 1509−1519, 2011.

EIBINGER, M. *et al.* Surface structural dynamics of enzymatic cellulose degradation, revealed by combined kinetic and atomic force microscopy studies. **FEBS Journal**, v. 281, p. 275–290, 2014.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood:** chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERREIRA, A.D. *et al.* Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, v. 28, p.547-554, 2011.

FLORY, P. J. **Principles of polymer chemistry**. New York: Ithacha, 1953.

FRENCH, A. D., CINTRO´N, M. S. Cellulose polymorphy, crystallite size, and the Segal Crystallinity Index. **Cellulose**, v. 20, p. 583-588, 2013.

FU, N. *et al.* A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/ xylose mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 210-217, 2009.

GAMBARATO, B. C. **Isolamento e caracterização de ligninas de palha de cana-de-açúcar / Bruno Chaboli Gambarato**, 2014. 106 p.: il. Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

GARLOCK, R.J. *et al.* Comparative material balances around pretreatment technologies for the conversion of switchgrass to soluble sugars. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11063–11071, 2011.

GARSIDE P., WYETH P. Identification of cellulosic fibres by FTIR spectroscopy I: thread and single fibre analysis by attenuated total reflectance. **Studies in Conservation.** v. 48, n. 4, p. 269-275, 2003.

GELLERSTEDT, G.; SJÖHOLM, E.; BRODIN, I. The wood-based biorefinery: a source of carbon fiber? **Open Agriculture Journal**, v. 4, p. 119-124, 2010.

GLASSER, W. G., BARNETT, C. A., SANO, Y. Classification of lignins with different genetic and industrial origins. **Journal of Applied Polymer Science**, Applied Polymer Symposia, v. 37, p. 441-460, 1983.

GLEASON, W.B.; BARKER, R. Oxidation of pentoses in alkaline solution. **Canadian Journal of Chemistry**, v.49, p. 1425-1432, 1971.

GRABBER, J.H. *et al.* Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, p. 455-465, 2004.

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

GOMIDE, J.L.; OLIVEIRA, R.C. Eficiência da antraquinona na polpação alcalina de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 3, n. 2, p. 208 - 220, 1979.

GOUVEIA, E. R. *et al.* Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, p.1-4, 2009.

HAHN-HÄGERDAL, B. *et al.* Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.74, p. 937–953, 2007.

HAMES, B.R. Biomass compositional analysis for energy applications. **Biofuels Humana Press.** v. 581, p. 145-167, 2009.

HARUN, M.Y. *et al.* Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (Eichhorniacrassipes). **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5193-9, 2011.

HATZIS, C., RILEY, C., PHILIPPIDIS, G. Detailed material balance and ethanol yield calculations for the biomass-to-ethanol conversion process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57/ 58, p. 443-459, 1996.

HE, J., CUI, S., WANG, S-Y. Preparation and crystalline analysis of high-grade bamboo dissolving pulp for cellulose acetate. **J Appl Polym Sci**, v.107, p. 1029-1038, 2008.

HEDJAZI, S. *et al.* Alkaline sulfite–anthraquinone (AS/AQ) pulping of wheat straw and totally chlorine free (TCF) bleaching of pulps. **Industrial Crops and Products**, v.29, p.27-36, 2009.

HENRIKSSON, H. *et al.* The active sites of cellulases are involved in chiral recognition: a comparison of cellobiohydrolase I and endoglucanase I. **FEBS Letters**, v. 390, p. 339-344, 1996.

HOEL, M.; KVERNDOKK, S. Depletion of fossil fuels and impacts of global warming. **Resources and Energy economics**, v.18, p. 115-136, 1996.

HOLTON, H.H.; CHAPMAN, F.L. Kraft pulping with anthraquinone: laboratory and full-scale mill trials. **Tappi Journal**, New York, v.60, n. 11, p. 139-153, 1977.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 94, n. 1, p.205–214, 2012.

IMAMOGLU, E,; SUKAN, F.V. Scale-up and kinetic modeling for bioethanol production. **Bioresource Technology.** v. 144, p. 311–320, 2013.

JERÔNIMO, L.H.; FOELKEL, C.E.B.; FRIZZO, S.M.B. Adição de antraquinona na polpação alcalina de *Eucalyptus saligna*. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 2, p. 31-37, 2000.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J.B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugar: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, p. 119-134, 2007.

KESHWANI, D. R., CHENG, J. J. Swithgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1515–1523, 2009.

KHAN, A. M. **Hydrolysis of hemicellulose by commercial enzyme mixtures**. Luleå: Luleå University of Technology, 2010.

KLINNER, U. *et al.* Aerobic induction of respiro-fermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast Pichia stipitis. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., v.67, p.247–253, 2005.

KLOCK, U.; MUNIZ, G. I. B. **Química da madeira,** 2. ed. Curitiba: FUPEP, 1998.

KOCHERBITOV, V. *et al.* Hydration of microcrystalline cellulose and milled cellulose studied by sorption calorimetry. **Journal of Physical Chemistry B**., v. 112, n. 12, p. 3728–3734, 2008.

KOCUREK, M.J., GRACE, T.M., MALCOLM, E.W. **Pulp and paper manufacture**. Montreal: CPPA, 1983. Joint Textbook Commitee of paper industry.

KOO, B. W. *et al.* Structural changes in lignin during organosolv pretreatment of Liriodendron tulipifera and the effect on enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 42, p. 24–32, 2012.

KREŽE, T.; STANA-KLEINSCHEK, K.; RIBITSCH, V. The sorption behavior of cellulose fibres. **Lenzinger Berichte**, v. 80, p. 28-33, 2001.

KUMAR, P. *et al.* Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713- 3729, 2009.

KUN, C. *et al.* Kinetics analysis of the enzymatic hydrolysis of cellulose from straw stalk. **Chin. J. Geochem**, v. 32, 41-46, 2013.

LAU, M.W; DALE, B.E. Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 106, n. 5, p.1368-73, 2009.

LANGFORD, J. I., WILSON, A. J. C. Scherrer after sixty years: a survey and some new results in the determination of crystallite size. **Jounal of Applied Crystallography**., v. 11, n. 2, p.102–113, 1978.

LAUREANO-PEREZ, L. *et al.* Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121–124, p. 1081–1099, 2005.

LEE, J-W. *et al*. Scale-up study of oxalic acid pretreatment of agricultural lignocellulosic biomass for the production of bioethanol. **Bioresource Technology.** v. 102 , p. 7451–7456, 2011.

LEE, S.H. *et al.* Ioninc liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 1368-1376, 2009.

LENGOWSKI, E. C. **Caracterização e predição da cristalinidade de celulose através de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada**. 2012. p. 73. Dissertação (Mestrado). Setor de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Paraná.

LEPPÄNEN, K. *et al.* Structure of cellulose and microcrystalline cellulose from various wood species, cotton and flax studied by x-ray scattering. **Cellulose**, v. 16, p. 999-1015, 2009.

LEVINE, S.E. *et al.* A mechanistic modelo of the enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, p. 37-51, 2010.

LIN, S.; DENCE, C. W**. Methods in lignin chemistry**. Berlin/New York: Springer-Verlag, 1992. 578p.

LONG, T.M. *et al.* Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Appl Environ Microbiol**., v. 78, n. 16, p. 5492–5500, 2012.

LYND, L.R. *et al.* How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 169-172, 2008.

LYND, L.R. *et al.* Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C.E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57/58, p. 741–761, 1996.

MANDELS, M.; ANDREOTT, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulose. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v.6, p. 2-34, 1976.

MANSFIELD, S.D.; MOONEY, C.; SADDLER, J.N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 804-816, 1999.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar**. 2009. 158p. Dissertação (Mestrado em Ciências Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARSON, G. A., SEOUD, O. A. E. Cellulose dissolution in lithium chloride/ n,ndimethylacetamide solvent system: relevance of kinetics of decrystallization to cellulose derivatization under homogeneous solution conditions. **Cellulose derivatization**, p. 3738-3744, 1999.

MAZIERO, P. *et al.* Structural features of lignin obtained at different alkaline oxidation conditions from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 61-69, 2012.

MCDOUGALL, G. J. *et al.* Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.62, p.1-20, 1993.

MCINTOSH, S.; VANCOV, T. Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. **Biomass and Bioenergy,** v. 35, p. 3094-3103, 2011.

MCMILLAN, J.D. **Xylose fermentation to ethanol**: a review. Golden, CO: NREL, 1993. 50p. Relatório técnico TP-421-4944.

MCNEIL, B.; HARVEY, L.M. **Fermentation** – a practical approach. Oxford: IRL PRESS at Oxford University Press, 1990.

MELO, M.A. **Avaliação da produção de bioetanol por linhagens de Spathaspora passalidarum isoladas da Floresta Amazônica Brasileira.** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

MESA, L. *et al.* The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, p. 1157-1162, 2011.

MIHRANYAN, A. *et al.* Moisture sorption by cellulose powders of varying crystallinity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 2, p.433–442, 2004.

MILANEZ, A.Y. *et al.* De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar – uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. ***BNDES Setorial* 41***,* p. 237-294, 2015.

MILESSI, T.S. *et al.* Hemicellulosic ethanol production by immobilized cells of *Scheffersomyces stipitis*: Effect of cell concentration and stirring. **Bioengineered**, v.6, n. 1, p. 26-32, 2015.

MINOR, J. L. Production of unbleached pulp. In: DENCE, C. W., REEVE, D. W. (eds) **Pulp bleaching:** principles and practice. Atlanta: TAPPI Press, p. 363-377, 1996.

MINU, K.; KURIAN JIBY, K.; KISHORE, V.V.N. Isolation and purification of lignin and silica from the black liquor generated during the production of bioethanol from rice straw. **Biomass and Bioenergy**. v. 39 (SI), p. 210-217, 2012.

MIRANDA JÚNIOR, M. *et al.* Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 3, 191–197, 2009.

MIYAFUJI, H. *et al.* Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates**. Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 396 – 400, 2003.

MONGKOLTHANARUK, W.; DHARMSTHITI, S. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 50, p. 101-105, 2002.

MOOD, S.H. *et al.* Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p.77–93, 2013.

MORAIS, S.A.L**. Contribuição ao estudo químico de Ligninas de *Eucalyptus grandis***. Belo Horizonte, 1987. 175p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFMG/ICEx, 1987.

MORAIS, S.A.L. **Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do Eucalyptus grandis:** Isolamento, quantificação e análise estrutural. Belo Horizonte, 1992.

MOSIER, N. *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-86, 2005.

MOYSÉS, D.N. *et al.* Xylose Fermentation by Saccharomyces cerevisiae: Challenges and Prospects. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 17, n. 3, p.207, 2016.

MUSSATTO, S.I., FERNANDES, M., ROBERTO, I.C., 2007. Lignin recovery from brewer's spent grain black liquor. **Carbohydr. Polym**., v. 70, p. 218–223.

NASCIMENTO, V.M. *et al.* Effect of Anthraquinone on Alkaline Pretreatment and Enzymatic Kinetics of Sugarcane Bagasse Saccharification: Laboratory and Pilot Scale Approach. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, v. 4(7), p. 3609–3617, 2016.

NGUYEN, N.H. *et al.* Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp nov and *Candida jeffriesii* sp nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p.1232-1241, 2006.

NORGREN, M. **On the physical chemistry of Kraft lignin:** Fundamental and applications. Thesis (Ph.D). Lund University. 2001.

OGBOMA, J.C.; MASHIMA, H.; TANAKA, H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. **Bioresource Technology**. v.76, p. 1-8, 2001.

OKONKWO, C.C. *et al.* Enhancing ethanol production from cellulosic sugars using *Scheffersomyces (Pichia) stipites*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 39, n. 7, p.1023-1032, 2016.

OLIVEIRA, R.; DRIEMEIER, C. CRAFS: a model to analyze two-dimensional X-ray diffraction patterns of plant cellulose. **Journal of Applied Crystallography**, v. 46, n. 4, p. 1196-1210, 2013.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**. v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000.

PALONEN, H. *et al.* Adsorption of *Trichoderma reseei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, p. 65-72, 2004.

PARK, S. *et al.* Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology Biofuels**, v. 3, p. 10, 2010.

PEREIRA, S. C. *et al.* 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnol Biofuels**, v. 8, n. 44, 2015.

PERSSON, T. *et al.* Fractionation of wheat and barley straw to access high-molecular-mass hemicelluloses prior to ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3906–3913, 2009.

PITARELO, A.P. *et al.* Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1502-1509, 2012.

PORTUGUÊS, R. G. V. **Síntese e caracterização da metilcelulose obtida a partir da metilação heterogênea do bagaço de cana-de-açúcar**. 2004. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2004.

*du* PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb Technol**., v.16, p.944–956, 1994.

QUIRINO, W. F. *et al.* Poder calorífico da madeira e de materiais ligno-celulósicos. **Revista da Madeira**, n.89, p. 100-106, 2005.

RABELO, S.C. *et al.* Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 102, p.7887-7895, 2011.

RAHMAN, M. S. **Food properties handbook**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 86p.

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

Ramos, L. P.; Saddler, J. N. Bioconversion of Wood Residues. In: **Enzymatic Conversion of biomass for fuels production**. Washington, DC: ACS Press. 1994. Cap.16. p. 325-341.

RANJAN, R. *et al.* Adsorption of fermentation inhibitors from lignocellulosic biomass hydrolyzates for improved ethanol yield and value-added product recovery. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 122, p. 143–148, 2009.

REGUANT, J. *et al.* Cellulose from softwood via prehydrolysis and soda/anthraquinone pulping. **Journal of wood chemistry and technology**, v. 17, n. 1-2, p. 91-110, 1997.

REZENDE, C.A. *et al.* Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 54, 2011.

ROCHA, G.J.M. *et al.* Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015 (a).

ROCHA, G.J.M. *et al.* Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 810–816, 2015 (b).

ROCHA, G.J.M. *et al*. Effect of Xylan and Lignin Removal by Hydrothermal Pretreatment on Enzymatic Conversion of Sugarcane Bagasse Cellulose for Second Generation Ethanol Production. **Sugar Tech**, v. 15, n. 4, p. 390 -398, 2013.

ROCHA, G.J.M. *et al.* Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 447–452, 2012 (a).

ROCHA, G.J.M. *et al.* Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p. 274-279, 2012 (b).

ROCHA, G. J. M. *et al.* A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN

AND OTHER WOOD COMPONENTS, 1997, Curitiba. **Anais**, Curitiba: UFPR, 1997, v.5.

RODRIGUES, R.C.L.B. *et al.* Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology,** v. 101, p. 1247-1253, 2010.

ROSSEL, C.E.V. Fermentação alcoólica do licor resultante da hidrólise. In: WORKSHOP DO PROJETO DIRETRIZES DE POLÍTICAS PÚBLICAS PARA A AGROINDÚSTRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, DA FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP).
Disponível em: *http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/HidroliseRosselFermentaçaodoHidrolisado.pdf.* Acesso em: 2007.

SALIBA, E.O.S. *et al.* Ligninas – Métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.917-928, 2001.

SANDA, T. *et al.* Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid Saccharomyces cerevisiae strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 7917–7924, 2011.

SANTOS, S.C. *et al.* Bioethanol production by recycled Scheffersomyces stipites in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. **Bioresource Technol**. v. 219, p. 319-329, 2016.

SANTOS, S.C. *et al.* Fermentation of xylose and glucose mixture in intensified reactors by *Scheffersomyces stipitis* to produce ethanol. **International Scholarly and Scientific Research & Innovation**. v. 9, n. 5, p. 496-501, 2015.

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

SANTOS, R. B. *et al.* Effects of hardwood structural and chemical characteristics on enzymatic hydrolysis for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 232-238, 2012.

SANTOS, M.L. *et al.* Estudo das condições de estocagem do bagaço de cana-de-açúcar por análise térmica. **Química Nova***,* v. 34, n. 3, p. 507-511, 2011.

SCHENCK, A.; BERGLIN, N.; UUSITALO, J. Ethanol from Nordic wood raw material by simplified alcaline soda cooking pre-treatment. **Applied Energy**, v. 102, p. 229-240, 2013.

SCHERRER, P. Bestimmung der Größe undder inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen. **Mathematisch-Physikalische Klasse**, v. 26, p. 98–100, 1918.

SCHMER, M. R. *et al.* Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. **Proceedings of the National Academy of Sciencies**. U.S.A., v. 105, p. 464–469, 2008.

SEABRA, J. E. A. **Análise de opções tecnológicas para uso integral da biomassa no setor de cana-de-açúcar e suas implicações.** 2008. 298p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SEGAL, L. *et al.* An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the x-ray diffractometer**. Textile Research Journal**, v. 29, p. 786–794, 1962.

SHAO, X. *et al.* Reactor scale up for biological conversion of cellulosic biomass to ethanol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v.33, p. 485–493, 2010.

SHARMAS, S. K.; KALAR, K. L.; GREWAL, H. S. Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 237–243, 2002.

SHI, J., XING, D., LI, J. FTIR Studies of the changes in wood chemistry from wood forming tissue under inclined treatment. **Energy Procedia**, v.16, p. 758-762, 2012.

SILVA, V.F.N. *et al.* Using cell recycling batch fermentations to validate a setup for cellulosic ethanol production. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 91, n. 6, p. 1853-1859, 2015.

SILVA, J.P.A. *et al.* (2012) Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by Pichia stipitis. **Renewable Energy**. v. 37, p. 259-265, 2012.

SILVA, V.F.N. *et al.* Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 7, p.809-817, 2011.

SILVA, A.A. *et al.* Milling pretreatment of sugarcane and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**. v, 101, p.7402-7409, 2010.

SILVERSTEIN, R.A. *et al.* A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technoogy**, v. 98, p. 3000–3011, 2007.

SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos.** 5 ed. Rio de Janeiro: Edit Guanabara Koogan S. A. 1994. p.146-151.

SINGH, R. *et al.* A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 713–728, 2014.

SINGH, R. *et al.* Lignin–carbohydrate complexes from sugarcane bagasse: Preparation, purification, and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 57–66, 2005.

SIPOS, B. *et al.* Hydrolysis efficience and enzyme adsorption on steam-pretreated spruce in the presence of poly(ethylene glycol). **Enzyme and Microbial Technology**, v.47, p. 84-90, 2010.

SKOOG, K.; HAHN-HAGERDAHL, B. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Appl Environ Microbiol**, v. 56, n. 11, p. 3389–3394, 1990.

SLININGER, P.J. *et al.* Repression of xylose-specific enzymes by ethanol in *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* and utility of repitching xylose-grown populations to eliminate diauxic lag. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 108, n. 8, 1801–1815, 2011.

SLININGER, P.J. *et al.* Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 1285–1296, 2006.

SOARES, P. A.; ROSSEL, C. E. V. **Conversão de celulose pela tecnologia Organosolv**. São Paulo: NAIPPE – USP, 2007. Nova Série, v. 3.

SOCCOL, C.R. *et al.* Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4820–4825, 2010.

SOTO, M. L. *et al.* Enzymatic saccharification of alkali-treated sunflower hulls. **Bioresource Technology**, v. 49, p. 53-59, 1994.

SOUZA, R.F.R. **Produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático do bagaço da cana-de-açúcar por leveduras isoladas do bioma amazônico**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

STEPHEN, J.D.; MABEE, W.E.; SADDLER, J. N. Will second-generation ethanol de able to compete with first-generation ethanol? Opportunities for cost reduction. **Biofuel. Bioprod. Bioref.**, v. 6, p. 159-176, 2012.

SU, YI-KAI; WILLIS, L.B.; JEFFRIES, T.W. Effects of Aeration on Growth, Ethanol and Polyol Accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 3, p.457-469, 2015.

SUN, X.F. *et al.* Isolation and characterization of cellulose obtained by a two-stage treatment with organosolv and cyanamide activated hydrogen peroxide from wheat straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 379-391, 2004.

SURINA, I. *et al.* Characterization of non-wood lignin precipitated with sulphuric acid of various concentrations. **BioResources**, v. 10, n. 1, p. 1408-1423, 2015.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v. *2*, p. 472-499, 2007.

TEJADO, A. *et al.* Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1655–1663, 2007.

THAKUR, V.K. *et al.* Progress in Green Polymer Composites from Lignin for Multifunctional Applications: A Review. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 5, p. 1072–1092, 2014.

TUCK, C.O. *et al.* Valorization of biomass: Deriving more value from waste. **Science**, v. 337, p. 695–699, 2012.

TURDERA, M.V. Energy balance, forecasting of bioelectricity generation and greenhouse gas emission balance in the ethanol production at sugarcane mills in the state of Mato Grosso do Sul. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** ,v. 19, p. 582–588, 2013.

UNREAN, P.; NGUYEN, N.H.A. Optimized fed-batch fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. **Appl Biochem Biotechnol,** v. 169, p. 1895–1909, 2013.

U.S. DOE. 2006. *Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda*, DOE/SC/EE-0095, U.S. Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy. (p. 94) (website)

VALE, A.T. *et al.* Potencial energético da biomassa e carvão vegetal do epicarpo e da torta de pinhão manso (Jatropha curcas). **CERNE**, v.17, n. 2, p. 267-273, 2011.

VARGAS-MORENO, J.M. *et al.* A review of the mathematical models for predicting the heating value of biomass materials. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.16, p. 3065-3083, 2012.

VARNÁI, A.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 185-193, 2010.

VILLAQUIRÁN, A.I. **Pulpeo de bagazo de cana por el proceso soda-antraquinona**, Tesis (Magíster Scientiae), Universidad de los Andes/ Facultad de Ciencias Florestales, Mérida, 1987.

VLASSOV, D. **Combustíveis, combustão e câmaras de combustão**. Curitiba: Editora UFPR. 2001.

WALTER, A. *et al.* Sustainability assessment of bio-ethanol production in Brazil considering land use change, GHG emissions and socio-economic aspects. **Energy Policy**. v. 39, n. 10, p. 5703–5716, 2011.

WATANABE, T. *et al.* A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. **Bioresource Technol**, v. 102, p. 1844-1848, 2011.

WEBB, S.R.; LEE, H. Regulation of D-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. **Biotechnology Advances**, v. 8, p. 685-697, 1990.

WEIL, J. *et al.* Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. **Enzyme and Microbial Technology,** v.16, n. 11, 1002– 1004, 1994.

WILDENBORG, T.; LOKHORST, A. Introduction on CO2 Geological storage-classification of storage options. **Oil Gas Sci Technol Rev IFP**, v. 60 p.513-515, 2005.

WOHLBACH, D.J. *et al.* Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 32, p.13212–13217.

XU, X. *et al.* Life cycle assessment of wood-fiber-reinforced polypropylene composites. **Journal of Materials Processing Technology**, v.198, p.168- 177, 2008.

YADAV, K.S. *et al.* Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipites*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6473-6478, 2011.

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

ZETIC, V. *et al.* Chromium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass. **Journal of Bioscience**, v. 26, n. 2, p.217-223, 2001.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward na agragated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797-824, 2004.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 2 (3), p. 51-68, 2009.

ZHU, L. *et al.* Structural features affecting biomass digestibility. **Bioresource Technology**, v. 99, p.3817-3828, 2008.

ZHU, L. **Fundamental study of structural features affecting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass.** Thesis (Doctoral Degree - Chemical Engineering). Texas A&M University, USA, 2005.

**Apêndice A.**

ACS Sustainable Chemistry & Engineering

Research Article

pubs.acs.org/journal/ascecg

# Effect of Anthraquinone on Alkaline Pretreatment and Enzymatic Kinetics of Sugarcane Bagasse Saccharification: Laboratory and Pilot Scale Approach

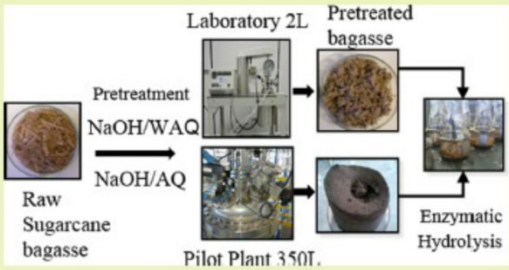
V. M. Nascimento,[†] S. C. Nakanishi,[†,‡] G. J. M. Rocha,[*,†] S. C. Rabelo,[†] M. T. B. Pimenta, and C. E. V. Rossell[†]

[†]Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Caixa Postal 6192, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10.000, CEP 13083-970 Campinas, São Paulo, Brasil

[‡]Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena − US. Estrada Municipal do Campinho, s/n - Pte. Nova, Lorena - SP, CEP 12602-810 Lorena, São Paulo, Brasil

*Supporting Information*

**ABSTRACT:** A laboratory (2 L) scale alkaline pretreatment with and without anthraquinone addition was performed to evaluate the influence of temperature, alkaline loading, residence time, heating and stirring system on mass yield and solubilization rates of the main components. The best conditions were scaled up to pilot scale (350 L), and enzymatic conversion of structural carbohydrates into sugars for cellulosic ethanol production was analyzed. The tested conditions were 130−170 °C, 0.5−1.5% NaOH, 30−90 min with and without 0.15% w/w of anthraquinone (AQ). The AQ addition did not lead to substantial cellulose preservation in the laboratory scale; however, in the pilot scale the AQ addition resulted in 67.4% and 28.5% of cellulose preservation for reactions at 130 °C, 1.5% NaOH, 30 min (5Pil) and 170 °C 1.5% NaOH, 30 min (7Pil) respectively in relation to those studies without addition. The most efficient heating and agitation system of pilot reactor was probably the determining factor for effective performance. Temperature also seems to have a maximal effect on pilot AQ pretreatments, where lower temperature (5 Pil-130 °C) favored the cellulose preservation in relation to experiments at 170 °C. The scale-up was successfully made and the condition 5Pil with AQ was chosen as the best one in order to produce 293 kg of glucose from 1 ton of raw sugarcane bagasse.




**KEYWORDS:** *Sugarcane bagasse, Sodium hydroxide, Anthraquinone, Scale up, Enzymatic kinetic*

## INTRODUCTION

In the 1970s, Brazil started a program to substitute ethanol for gasoline in order to decrease the dependence from petroleum fuels in a politically and economically variable period, using sugarcane as feedstock.[1] Since then, agricultural and technological studies have greatly intensified leading Brazil to a very favorable position in terms of energy security.[1]

In the 2015/2016 harvest, around 659 million tons of sugarcane are estimated to be crushed.[2] However, despite the large amounts of production, only one-third of the plant is used for sugar and/or alcohol production, one-third is bagasse, which is burnt for electricity production, and the remaining one-third (straw) is left in the field, which is decomposed by microorganisms.[3]

The raw material represents 40−70% of the first-generation ethanol production cost[4] and a significant increase in the production can be reached if technologies to convert the polysaccharides from biomass are developed (straws and bagasse of sugarcane into ethanol).[5]

Pretreatment is a key step for second-generation ethanol production, because it has a large impact on the efficiency of the overall bioconversion.[6,7] On the basis of the lignocellulose heterogeneity, only about 20% of raw biomass is hydrolyzed without disrupting the recalcitrant carbohydrate−lignin structure.[1,8,9]

Recently, numerous strategies for biomass pretreatment have been developed in order to produce highly digestible solids to enhance sugar yields during enzymatic hydrolysis, to avoid sugar degradation and to provide minimal inhibitors for subsequent fermentation steps.[10]

It has been estimated that the amount of degradation products produced during acid pretreatments is 2 times higher than that of alkaline pretreatments. Degradation compounds can inhibit enzymes and microorganisms in the hydrolysis and fermentation processes. Pretreatments that generate large

Received: November 5, 2015
Revised: April 29, 2016
Published: May 20, 2016

 © 2016 American Chemical Society 

DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b01433
ACS Sustainable Chem. Eng. 2016, 4, 3609−3617

amounts of degradation products need a detoxification step, which can add cost in the process.

The application of anthraquinone (AQ) as a catalyst in alkaline pulping has been well documented in scientific studies for paper and pulping applications to accelerate pulp delignification and gain higher yields.[11]

A huge amount of work has been devoted to the chemistry of alkaline pulping, particularly kraft pulping of woods; however, just a few studies regarding the chemistry of the soda–anthraquinone (AQ) pulping, often applied to nonwoody lignocellulosic materials, have been done, especially with pilot scale experiments.[12]

This work reports a laboratory $2^3$ experimental design of a soda–anthraquinone pretreatment in order to evaluate the influence of temperature, alkaline loading and residence time on mass yield and solubilization rates. After the scale-up, the effects on enzymatic conversion were analyzed.

Efficient processes from conversion of lignocellulosic materials to ethanol remain to be developed. Besides, some commercial lignocellulosic ethanol production units are starting to operate.[13,14] Therefore, the scale-up of the selected experiments is a good opportunity to evaluate the reproducibility of bench scale results and to evaluate the influence of different heating and stirring systems to provide results for possible commercial scale applications.

## MATERIALS AND METHODS

**Raw Material.** Fresh sugarcane bagasse (50% of moisture content) was provided by the sugar and ethanol plant Pedra Agroindustrial located in Serrana, São Paulo, Brazil. The material was dried at room temperature.

A portion of bagasse was milled to a particle size of 20 mesh and used for physical–chemical characterization of lignocellulosic materials.

**Pretreatment.** The sodium hydroxide with anthraquinone pretreatment in laboratory scale (Lab) was carried out in a 2 L capacity reactor (Parr instruments (USA) - 4532 Floor Stand Reactor, 2000 mL, Moveable Cart w/4848 Controller), with a mechanical agitation system for complete mixture. Pretreatment time, temperature and alkali loading were evaluated during the experiments. The selected conditions were also performed without anthraquinone addition in order to evaluate the effect of this additive in cellulose preservation and enzymatic hydrolysis yield.

In each pretreatment experiment, 50 g of dry sugarcane bagasse was placed into the reactor with 500 mL of sodium hydroxide solution (according to experimental design) and with or without 0.15% (w/w) of anthraquinone (AQ).

The reactor was hermetically closed and heated until the working temperature was reached. When the reaction time had elapsed, the reactor was discharged, and the solid fraction (hereafter referred to as cellulignin) was separated from the lignin-rich soluble fraction by filtration in a Buchner filter. The cellulignin was thoroughly washed until neutral pH.

In pilot scale (Pil), a 350 L capacity 276 hastelloy steel reactor (Pope Scientific INC), equipped with a stirrer and heated through a jacket with thermal oil or steam injection, was used. The reactor was loaded with 180 L of water and heated to 90 °C. After that, 12 kg of dry sugarcane bagasse and NaOH solution was added. The final liquid-to-solid ratio was 15:1. The reaction mixture was heated to the experiment temperature and held under stirring for the reaction time.

When the reaction time had elapsed, the reactor was discharged, and the solid fraction (hereafter referred to as cellulignin) was separated from the lignin-rich soluble fraction by filtration in a Nutshe filter with 100 L capacity (Pope Scientific INC). The cellulignin was thoroughly washed in the Nutshe filter until neutral pH. Reactions were performed in duplicate.

After pretreatment the solid fractions, laboratory and pilot scale were weighted to determine mass yield, submitted to physical–chemical characterization and stored at 4 °C for further enzymatic hydrolysis reactions.

The pretreatment mass yield was calculated according to eq 1.

$$PM = m_{final}/m_{initial} \times 100 \quad (1)$$

Where $m_{initial}$ is the initial mass of the sugarcane bagasse (g), $m_{final}$ is mass of the cellulignin after pretreatment (g) and PM is the pretreatment mass yield.

The solubilizations of cellulose, lignin and hemicellulose were calculated according to eq 2.

$$S = 100 \times (m_i \cdot y_i - m_i \cdot PM \cdot y_f)/(m_i \cdot y_i) = 100 \times (1 - PM(y_f/y_i)) \quad (2)$$

Where $S$ is solubilization of component (%), $m_i$ is the initial mass of the sugarcane bagasse (g), $y_i$ is the component content from the raw biomass (%), $y_f$ is the component content from the pretreated biomass (cellulignin) (%) and PM is the pretreatment mass yield.

**Enzymatic Hydrolysis.** One gram of the pretreated bagasse was hydrolyzed with 10 mL of solution containing citrate buffer (0.05 mol·$L^{-1}$), 10 FPU of cellulase (Celuclast) and 20 U of $\beta$-glucosidase (Novozym 188) with pH adjusted to 4.8.

Hydrolysis experiments were carried out in 125 mL flasks in an orbital shaker (New Brunswick 24 incubator series) agitated at 200 rpm at 50 °C. Aliquots were taken 24, 48 and 72 h after the reaction time, and the hydrolysates were heated in boiling water bath for 5 min in order to precipitate the protein and prevent further hydrolysis. The fiber residue was separated from hydrolysate by filtration and washed with 15 mL of distilled water, in order to recover the sugars content adsorbed in the solid fraction. Sugars contained in filtrate were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC).

The enzymatic conversion was calculated according to eq 3.

$$EC = (m_{glucose} \times f_h)/(m_{initial} \times y_i) \times 100 \quad (3)$$

Where EC is enzymatic conversion, $m_{glucose}$ is the glucose mass in the hydrolysate (w), $m_i$ is the initial mass of the sugarcane bagasse (g), $y_i$ is the cellulose content in the biomass and $f_h$ is the cellulose hydrolysis factor (0.9).

**Chemical Characterization of Lignocellulosic Materials.** Chemical compositions (cellulose, hemicellulose and lignin) of the solid materials (raw sugarcane bagasse and cellulignins from laboratory and pilot scales) were determined according to Gouveia et al. (2009).[15]

Cellobiose, glucose, xylose, arabinose and acetic acid were separated with an Aminex HPX 87H (300 × 7.8 mm, BIO-RAD) at 45 °C using 5 mM $H_2SO_4$ as mobile phase at a flow rate of 0.6 mL $min^{-1}$, and detected with an RI detector (Shimadzu RID-6A). Furfural and hydroxymethilfurfural (HMF) were separated on an RP-18 (C-18) 125 × 4 mm column (Hawlett-Packard), and detected with a UV–visible detector (Shimadzu SPD-10A) at 25 °C using a mobile phase composed of 1% acetic acid-containing 1:8 acetonitrile–water solution pumped at 0.8 mL $min^{-1}$.

## RESULTS AND DISCUSSION

The pretreatment involves factors besides the effectiveness of biomass deconstruction, such as reactor design, transport phenomena in heat and mass transfer, lower chemical and additives costs, processing requirements and parameters. All factors are extremely important to ensure that data from bench scale pretreatment system also lead to cost-effective scale-up.

The first goal to be achieved in order to realize a successful demonstration and commercial plant is to provide data for a large scale pilot plant, which represents the basis for performing formal processing and economic assessments of converting biomass feedstocks into resources at commercial biorefineries.



DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b01433
ACS Sustainable Chem. Eng. 2016, 4, 3609–3617

**Table 1. Chemical Composition of the Raw Sugarcane Bagasse and Design Matrix Presenting Cellulose, Hemicellulose and Lignin Content after the Pretreatment and the Pretreatment Mass Yield for the Samples with Sodium Hydroxide and Anthraquinone[a]**

| assays | t (min) | T (°C) | NaOH (%, w/v) | PM (%) | Cel (%)[b] | Hemi (%)[b] | Lig (%)[b] | Extract (%) | Ashes (%)[b] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| raw sugarcane bagasse | | | | | 42.6 | 26.2 | 22.5 | 5.3 | 4.3 |
| 1 | 30 | 130 | 0.5 | 78.8 | 36.7 | 20.4 | 19.1 | | 2.7 |
| 2 | 90 | 130 | 0.5 | 86.0 | 41.8 | 23.0 | 20.1 | | 1.5 |
| 3 | 30 | 170 | 0.5 | 71.5 | 37.2 | 16.7 | 15.4 | | 2.5 |
| 4 | 90 | 170 | 0.5 | 68.1 | 34.8 | 14.6 | 13.9 | | 4.6 |
| **5** | **30** | **130** | **1.5** | **61.2** | **34.1** | **15.2** | **5.9** | | **4.9** |
| 6 | 90 | 130 | 1.5 | 55.5 | 33.0 | 15.3 | 7.1 | | 1.6 |
| **7** | **30** | **170** | **1.5** | **56.4** | **35.9** | **13.7** | **4.3** | | **2.0** |
| 8 | 90 | 170 | 1.5 | 53.1 | 32.6 | 12.8 | 5.4 | | 2.4 |
| 9 | 60 | 150 | 1.0 | 62.1 | 35.0 | 15.8 | 7.6 | | 1.7 |
| 10 | 60 | 150 | 1.0 | 59.2 | 33.8 | 15.0 | 7.3 | | 2.2 |
| 11 | 60 | 150 | 1.0 | 59.3 | 34.1 | 15.0 | 7.5 | | 1.8 |

[a]$2^3$ full factorial design. t, time; T, temperature; Cel, cellulose; Hemi, hemicellulose; Lig, lignin; Extract, extractives; PM, pretreatment mass yield. [b]Values were corrected multiplying component percentage by pretreatment yield.

**Pretreatment: Optimization of NaOH/AQ Pretreatment in Laboratory Scale.** A $2^3$ full factorial design with 3 replicates in the central point was performed for the sodium hydroxide pretreatment with anthraquinone addition. The objective was to evaluate the influence of pretreatment operational conditions (time, temperature and NaOH loading) on the subsequent cellulose, hemicellulose and lignin solubilization. The selected conditions were scale-up and submitted to enzymatic hydrolysis.

Table 1 shows the chemical composition of the raw sugarcane bagasse and the design matrix, cellulose, hemicellulose and lignin content after the pretreatment and the pretreatment mass yield.

The chemical composition is according to previous results reported in the literature.[16−20]

As investigated by Rocha et al. (2015),[21] in general, the composition of the main components of the raw sugarcane bagasse did not differ significantly among different harvest samples, with the hemicellulose content between 25.6 and 29.6%, cellulose 36.9−45.7% and lignin 18.9−26.1%.

According to Table 1, maximum lignin solubilization, 81%, was obtained with the pretreatment performed at 170 °C, 30 min, 1.5% NaOH (assay 7). High solubilization rates were also achieved to assay 5 (130 °C, 30 min, 1.5% NaOH) and 8 (170 °C, 90 min, 1.5% NaOH), with almost 75% of lignin removal.

The cellulose showed an average solubilization rate of 21% in the different pretreatment conditions (assays 5, 6, 8, 9, 10 and 11). According to the chemical composition of the cellulignins (Table 1), the contents of cellulose and hemicellulose in the solid material increased by approximately one-third compared to their content in the raw bagasse, whereas the lignin content decreased by around 80%.

Arantes et al. (2009)[22] realized a pretreatment of sugarcane bagasse with NaOH 16% (w/v) at 160 °C for 60 min and observed a bagasse solubilization (PM (%)) of 58.5% (w/w) with 70.9% of cellulose, 24.9% of hemicellulose and 1.72% of lignin in the solid material (cellulignins).

Assays 7 and 8 showed high solubilization of hemicellulose, 47.5% and 51.2%, respectively. The samples 5, 6, and central point also showed high hemicellulose solubilization rates, with an average of 41.8%.

The side groups of xylan may play an important role in the bonding of lignin to hemicellulose, especially the arabinose and the acetyl substituents, which affect the physicochemical properties.[21] Table 2 shows the intercomponent relationships of cellulignins obtained after each pretreatment condition.

**Table 2. Chemical Composition of Cellulignins Obtained after Each Pretreatment Condition of Experimental Design: Hemicellulose, Cellulose and Lignin Elements Ratios[a]**

| assays | Xyl/Arab | Gluc/Xyl | Gluc/Arab | Cell/Hemi | insoluble Lig/soluble Lig |
|---|---|---|---|---|---|
| raw sugarcane bagasse | 10 | 1.9 | 18.1 | 1.6 | 8.4 |
| 1 | 10 | 2.0 | 16.7 | 1.8 | 2.0 |
| 2 | 10 | 2.0 | 17.8 | 1.8 | 1.9 |
| 3 | 11 | 2.4 | 26.2 | 2.2 | 1.9 |
| 4 | 12 | 2.5 | 31.2 | 2.4 | 1.8 |
| 5 | 11 | 2.4 | 25.3 | 2.2 | 0.3 |
| 6 | 11 | 2.3 | 24.8 | 2.2 | 0.5 |
| 7 | 12 | 2.8 | 33.2 | 2.6 | 0.2 |
| 8 | 18 | 2.6 | 46.9 | 2.6 | 0.3 |
| 9 | 10 | 2.4 | 23.9 | 2.2 | 0.6 |
| 10 | 10 | 2.4 | 24.4 | 2.3 | 0.6 |
| 11 | 10 | 2.5 | 24.6 | 2.3 | 0.6 |

[a]Hemi, hemicellulose; Arab, arabinose; Xyl, xylose; Gluc, glucose; Cell, cellulose; Lig, lignin.

According to Table 2, arabinose groups are present in the xylose/arabinose ratio of approximately 10:1, showing that for each 10 xylose sugar units in the hemicellulose chain there is 1 arabinose. However, considering samples 7 and 8 performed with the high alkaline loading and temperature conditions (30 min, 170 °C, 1.5% (w/v) NaOH and 90 min, 170 °C, 1.5% NaOH w/v respectively), this ratio showed an important increase, which can be attributed to more arabinose removal during alkaline pretreatment.

Xylan in grasses consists of a linear polymer of $\beta$-(1,4)-linked xylose residues substituted with acetyl, glucuronic acid (GlcA), 4-O-methylglucuronic acid (Me-GlcA) and arabinose residues.[23] Xylan may also covalently linked to lignin via ester bonds to GlcA and ether bonds to Xyl or Ara,[24,25] and the ferulic acid esters in grass xylans can undergo oxidative dimerization to form cross-links to adjacent xylan chains or



DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b01433
ACS Sustainable Chem. Eng. 2016, 4, 3609−3617

to lignin. So, xylan main chains are more stable due to the stabilizing effect of the side groups adjacent to the reducing end of the chain, whereas the arabinose and acetyl side groups in softwood xylans are easy to be cleaved.[26] The fact that during the pretreatment the lignin linkages are cleaved leading to the substituents elimination, and considering that arabinose are linked to adjacent lignin by ferrulic acid, can be related by preferential arabinose removal from hemicellulose in relation to xylan.[27]

Lignin is the biomass content with high variability, in relation to the hemicellulose and cellulose. From the data in Table 2, the high alkaline loading and temperature conditions (7 and 8) promoted more lignin fragmentation and removal, with the disruption of the lignin−carbohydrate complex, resulting in low insoluble acid lignin content.

**Pretreatment: Statistical Analysis of NaOH/AQ Pretreatment in Laboratory Scale.** To determine the influence of the factors considered on cellulose, hemicellulose and lignin solubilization, regression models were proposed and response surfaces plotted. The statistical analysis was performed using the software Statistica (Statsoft, v. 10.0) and the confidence level considered was 90%. Significant effects are marked in bold ($p$ value <0.1).

The cellulose solubilization, at the 90% confidence level, sodium hydroxide loading and all the interactions between pretreatment time, temperature and NaOH loading are significant at the 90% confidence level (p value <0.1). Concentration of NaOH is the most important factor affecting this response.

Considering the hemicellulose solubilization, temperature, NaOH loading, as also time−temperature, temperature-NaOH and time−temperature-NaOH interactions are significant at the 90% confidence level (p value <0.1). Lignin solubilization showed that all the factors and interactions are significant at the 90% confidence level (p value <0.1). The scaled regression coefficients of the regression model of cellulose solubilization after sodium hydroxide with anthraquinone pretreatment can be found in Table S1 of the Supporting Information.

Table 3 depicts the analysis of variance (ANOVA) for the model of cellulose solubilization, hemicellulose and lignin solubilization after sodium hydroxide with anthraquinone pretreatment when only the significant coefficients are taken into account.

The model for cellulose solubilization presents high correlation coefficient with the $F$-value for statistical significance of the regression (10.35) higher than the listed one (3.18) and the $F$-value for lack of fit (4.25) is smaller than the listed one (9.25).

The model for hemicellulose solubilization showed the $F$-value for statistical significance of the regression (22.95) higher than the listed one (3.45) and the $F$-value for lack of fit (4.40) is smaller than the listed one (9.16).

Therefore, it can be seen that the cellulose and hemicellulose solubilization models present high correlation coefficients and can be considered statistically significant with 90% of confidence according to the $F$ test, and it does not present evidence of lack of fit, as the calculated value for the $F$ test.

Instead of the other models, the lignin solubilization showed an $F$-value for statistical significance of the regression (3.64) smaller than the listed one (5.27) and the $F$-value for lack of fit (2206.1) is higher than the listed one (8.53), indicating that lignin solubilization cannot be considered statistically significant with 90% of confidence.

**Table 3. ANOVA for the Model of Cellulose Solubilization by Sodium Hydroxide Pretreatment with Anthraquinone**

| source of variation | sum of squares (SS) | degrees of freedom | mean square (MS) | $F$-value |
|---|---|---|---|---|
| cellulose solubilization | | | | |
| regression ($R$) | 339.78 | 5 | 67.96 | 10.35[a] |
| residual ($r$) | 32.82 | 5 | 6.56 | |
| lack of fit (faj) | 28.37 | 3 | 9.46 | 4.25[b] |
| pure error (ep) | 4.45 | 2 | 2.22 | |
| total ($T$) | 372.60 | 10 | | |
| $F$ listed value | | | | $F_{4,6}{}^{a} = 3.18$ $F_{4,2}{}^{b} = 9.24$ |
| hemicellulose solubilization | | | | |
| regression ($R$) | 1245.13 | 5 | 249.03 | 22.95[a] |
| residual ($r$) | 54.26 | 5 | 10.85 | |
| lack of fit (faj) | 48.30 | 3 | 16.10 | 5.40[b] |
| pure error (ep) | 5.96 | 2 | 2.98 | |
| total ($T$) | 1299.39 | 10 | | |
| $F$ listed value | | | | $F_{5,5}{}^{a} = 3.45$ $F_{3,2}{}^{b} = 9.16$ |
| lignin solubilization | | | | |
| regression ($R$) | 5809.46 | 7 | 829.92 | 3.64[a] |
| residual ($r$) | 683.42 | 3 | 227.81 | |
| lack of fit (faj) | 682.81 | 1 | 682.81 | 2206.16[b] |
| pure error (ep) | 0.62 | 2 | 0.31 | |
| total ($T$) | 6492.89 | 10 | | |
| $F$ listed value | | | | $F_{7,3}{}^{a} = 5.27$ $F_{1,2}{}^{b} = 8.53$ |

[a] $F$ test for statistical significance of the regression (MSR/MSr). [b] $F$ test for lack of fit ($MS_{faj}/MS_{ep}$)

The response surface of cellulose solubilization versus time and sodium hydroxide loading when pretreatment temperature (the less significant factor) is maintained at the central point is depicted in Figure 1a and the response surface of hemicellulose solubilization versus temperature and sodium hydroxide loading, with time maintained at the central point is depicted in Figure 1b.

From Figure 1a, it can be seen that for high sodium hydroxide loadings, the influence of time on cellulose solubilization is low, which indicates that pretreatment with sodium hydroxide with anthraquinone can be performed with low times.

Delignification reaction on cellulignins from steam explosion pretreatment (190 °C/15 min) showed NaOH loading as the most important variable on cellulose solubilization rates.[28] From Figure 1b, it can be noticed that hemicellulose solubilization is higher for high pretreatment NaOH loading and temperature.

The fact that lignin solubilization cannot be considered statistically significant can be attributed with interferences and wrong lignin quantification.

The relative lignin degradation was qualitatively analyzed by FTIR spectra, based on the peak at 1510 $cm^{-1}$. This band is considered indicative of the aromatic character of the lignin,



DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b01433
ACS Sustainable Chem. Eng. 2016, 4, 3609−3617

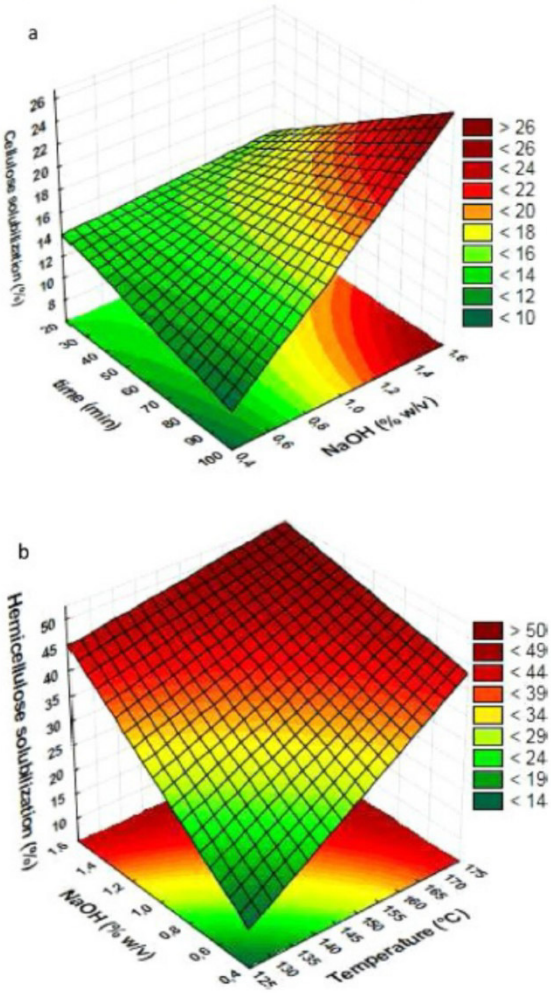



**Figure 1.** (a) Response surface of cellulose solubilization versus time and sodium hydroxide concentration when pretreatment temperature (the less significant factor) is maintained at the central point; (b) response surface of hemicellulose solubilization versus temperature and sodium hydroxide concentration, with time maintained at the central point (the response surface was achieved using the software Statistica (Statsoft, v. 10.0)).

resulting semicircle ring stretching, with less carbohydrates bands influence.[29,30]

Figure 2 shows the correlation between the absorption band at 1510 $cm^{-1}$ and lignin content quantified according to a physical–chemical methodology and the FTIR spectra at 1510 $cm^{-1}$ for the cellulignins pretreated with NaOH and anthraquinone.

The correlation reported in Figure 2 suggests a linear relantionship beteween the chemical lignin content and FTIR lignin content. Notwithstanding the absorption in 1510 $cm^{-1}$ decreases as the delignification rate increases, it is possible to observe that the characteristic lignin absorption band in 1510 $cm^{-1}$ almost desappears with 7–10% of lignin content.

The physical–chemical quantification of lignin content is based on gravimetric quantification, so possibly the reported lignin content does not represent only lignin but also tanins, aromatic groups and terpenes that may have condensated with lignin during the chemical characterization process (acid insoluble lignin) or quantified wrongly as acid soluble lignin. The literature reported that these compounds have absorption in the same UV–vis region, 280 nm, the same band used to quantify acid soluble lignin.

To provide information about the influence of the anthraquinone, the selected conditions were also performed, in laboratory scale, without catalyst addition. The pretreatment reactions without were performed in the same reactor and conditions, as previously cited.

Table 4 shows a comparative of the physical–chemical composition of the solid fractions, referred as cellulignins, after pretreatments performed with and without anthraquinone addition in laboratory scale and the respectively pretreatment mass yield in conditions 7 (30 min, 170 °C and 1.5% NaOH) and 5 (30 min, 130 °C, 1.5% NaOH).

According to Table 4 and otherwise as expected, the anthraquinone addition did not lead to substantial cellulose preservation in the laboratory scale conditions, with the reaction 7LabAQ resulting in 15.7% of cellulose solubilization in relation of 17.7% obtained from 7Lab WAQ.

The laboratory scale experiments are extremely necessary as an intermediate step between bench- and pilot scale in order to identify operational parameters and potential problems associated with scale-up.[31] According to solubilization rates, the samples 7 (170 °C, 30 min, 1.5% NaOH w/v) and 5 (130 °C, 30 min, 1.5% NaOH w/v) were selected.

**Scaling up of Selected Reactions Conditions, with and without AQ.** The selected conditions were performed in pilot scale, with and without AQ addition, and submitted to enzymatic hydrolysis.

A common trend in the research on second-generation bioethanol is increasing the concentration of water-insoluble solids throughout the process.[32] However, increasing the lignocellulosic materials content in the reactor resulted in problems related to poor mixing of the material, which leads to deposition of biomass under the impeller, which makes it difficult to achieve an equal distribution of alkaline reactants in the mixture, resulting in pretreatment yield reduction and some unreacted sample parts.

To overcome this mixing factor, although efforts have been made to overlook these important scale-up problems, pilot scale reactions were performed using a different solid-to-liquid ratio (1:15).

Although a different solid-to-liquid ratio was used in the pilot scale reaction, the pretreatment efficiency was not affected, a fact that can be confirmed based on similar physical–chemical characterization of pretreated samples achieved on laboratory and pilot scales that will be presented below.

According to Chen (2013),[33] alkali concentration (g NaOH/g pretreatment liquid) has been widely used as an indication of alkali strength in the literature, however, the experimental results suggested that alkali loading based on total solids (g NaOH/g dry biomass) governs the pretreatment efficiency and 10–15% (w/w) solids loading or biomass particle size of up to 10 mm does not affect pretreatment efficiency.[34]

Table 5 depicts the chemical composition of the solid fractions, referred as cellulignins, after pretreatments performed with and without anthraquinone addition in pilot scale and the respectively pretreatment mass yield and enzymatic conversion. Figure S1 of the Supporting Information provides the



DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b01433
ACS Sustainable Chem. Eng. 2016, 4, 3609–3617

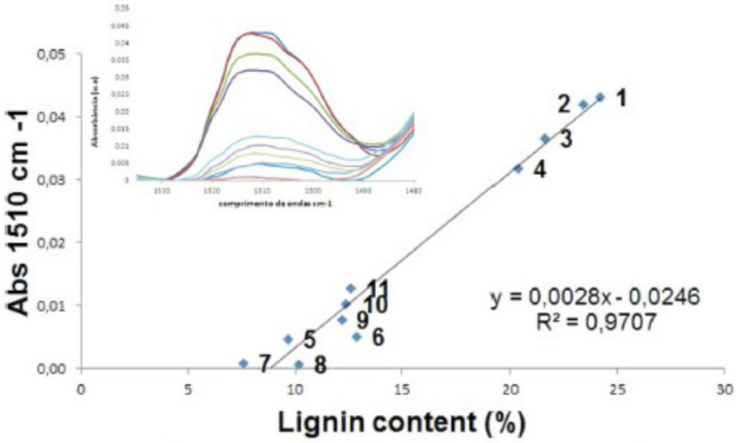



**Figure 2.** FT-IR absorption band at 1510 $cm^{-1}$ spectra and lignin content of cellulignins obtained in the sodium hydroxide and anthraquinone pretreatment reactions.

**Table 4. Mass Yield, Cellulose, Hemicellulose and Lignin Content of the Laboratory Scale Pretreatments Performed with and without Anthraquinone Addition**[a]

| assay | t (min) | T (°C) | NaOH (%, w/v) | PM (%) | cellulose (%)[b] | hemicellulose (%)[b] | lignin (%)[b] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5Lab $W_{AQ}$ | 30 | 130 | 1.5 | 66.9 ± 0.4 | 38.1 ± 2.0 | 17.8 ± 0.9 | 8.5 ± 1.3 |
| 5Lab AQ | 30 | 130 | 1.5 | 61.2 ± 0.6 | 34.1 ± 0.1 | 15.2 ± 0.15 | 5.9 ± 0.6 |
| 7Lab $W_{AQ}$ | 30 | 170 | 1.5 | 55.5 ± 0.5 | 35.1 ± 1.9 | 13.3 ± 0.76 | 2.7 ± 0.8 |
| 7Lab AQ | 30 | 170 | 1.5 | 56.4 ± 0.6 | 35.9 ± 1.5 | 13.7 ± 0.7 | 4.3 ± 0.9 |

[a]Lab WAQ, pretreatment in laboratory scale without anthraquinone addition; Lab AQ, pretreatment in laboratory scale with anthraquinone addition. [b]Values were corrected multiplying component percentage by pretreatment yield.

**Table 5. Mass Yield (PM %), Cellulose, Hemicellulose, Lignin Content and Enzymatic Conversion (EC %) of the Pilot and Laboratory Scale Pretreatments Performed with and without Anthraquinone Addition**[a]

| assay | t (min) | T (°C) | NaOH (%,w/v) | PM (%) | cellulose (%) | hemicellulose (%) | lignin (%) | EC (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5PIL $W_{AQ}$ | 30 | 130 | 1.5 | 52.2 ± 1.6 | 30.6 ± 1.2 | 11.5 ± 1.4 | 4.6 ± 0.9 | 71.0 ± 1.4 |
| 5PIL AQ | 30 | 130 | 1.5 | 64.0 ± 0.2 | 38.7 ± 1.1 | 15.4 ± 0.5 | 5.6 ± 0.9 | **68.2 ± 0.3** |
| 7PIL $W_{AQ}$ | 30 | 170 | 1.5 | 52.7 ± 2.9 | 33.3 ± 3.8 | 11.1 ± 1.5 | 3.7 ± 2.0 | 70.7 ± 1.0 |
| 7PIL AQ | 30 | 170 | 1.5 | 53.2 ± 0.3 | 35.6 ± 0.3 | 12.1 ± 1.5 | 2.8 ± 1.8 | **55.1 ± 1.4** |
| 5Lab $W_{AQ}$ | 30 | 130 | 1.5 | 66.9 ± 0.4 | 38.1 ± 2.0 | 17.8 ± 0.9 | 8.5 ± 1.3 | 67.3 ± 0.9 |
| 5Lab AQ | 30 | 130 | 1.5 | 61.2 ± 0.6 | 34.1 ± 0.1 | 15.2 ± 0.15 | 5.9 ± 0.6 | **64.5 ± 0.8** |
| 7Lab $W_{AQ}$ | 30 | 170 | 1.5 | 55.5 ± 0.5 | 35.1 ± 1.9 | 13.3 ± 0.76 | 2.7 ± 0.8 | 66.5 ± 0.8 |
| 7Lab AQ | 30 | 170 | 1.5 | 56.4 ± 0.6 | 35.9 ± 1.5 | 13.7 ± 0.7 | 4.3 ± 0.9 | **48.3 ± 0.5** |

[a]Lab WAQ, pretreatment in laboratory scale without anthraquinone addition; Lab AQ, pretreatment in laboratory scale with anthraquinone addition; Pil $W_{AQ}$, pretreatment in pilot scale without anthraquinone addition; Pil AQ, pretreatment in pilot scale with anthraquinone addition.

enzymatic conversion of cellulose versus time for samples pretreated in pilot scale with and without anthraquinone addition.

Anthraquinone has been used for years as an efficient additive in pulp and paper processes using wood as raw material, which contributes to cellulose preservation and allows for high delignification yields.[35]

The complex hierarchy structure of lignocellulosic biomass is the main obstacle for key components pretreatment, where cellulose, hemicellulose and lignin are hindered by many physicochemical, structural and compositional factors.[36]

In pilot scale, the AQ addition resulted in 67.4% and 28.5% of cellulose preservation for reactions at 130 °C (5Pil) and 170 °C (7Pil) respectively, in relation to those studies without it added.

The AQ addition in the pretreatment leads to a stabilization of alkaline degradation (peeling effect) as it promotes the formation of aldonic acid in the polysaccharide end groups, preserving cellulose and enhancing only the degradation of lignin.[37,38]

The experimental conditions, such as temperature, heating curve, reaction time and agitation system, can be attributed as main factors for different AQ diffusion rates and consequently different catalyst concentrations in the fiber, which significantly alters the delignification and cellulose preservation percentage.

A reactor operating with the most efficient heating system as thermal fluid and steam, and a robust agitation system in relation to the 2 L reactor (laboratory scale) were probably the determining factors for the more effective performance of anthraquinone in the pilot scale experiments.



DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b01433
ACS Sustainable Chem. Eng. 2016, 4, 3609−3617

In addition, temperature seems to have a maximal effect on AQ pretreatments performed in pilot scale, where at lower temperature ranges (5 Pil-130 °C) the preservation of cellulose was favored in relation to experiments at 170 °C. A fact that can be attributed to competition between the carbohydrates solubilization during the pretreatment process (degradation of cellulose by peeling effect favored at high temperatures) and AQ diffusion for reducing ends stabilization.

The pilot equipment operated satisfactorily, and reproducible ratings were reached, considering that the process at large scale is still relatively unexplored, and more research is required to overcome certain challenges such as high quantity materials handling, equipment mass transfer limitations and rheological problems.

The substrate dramatically changes after pretreatment processes, becoming more susceptible to acid and/or enzymatic hydrolysis due to the modifications in the biomass structures. Many pretreatments act differently on the cell wall structure, with varied results as cellulosic microfibrils exposure and lignin removal.[39,40]

According to Table 5, the AQ addition resulted in a decrease of enzymatic digestibility of pretreated samples, with 7Lab WAQ presenting a 27.4% higher enzymatic conversion than 7 Lab AQ), and the 7 PIL WAQ with 22% higher conversion than 7 PIL AQ. However, for the samples performed under less severe conditions (130 °C), this behavior was less pronounced, with both conditions 5Lab WAQ and 5Pil WAQ presenting a 4% higher enzymatic conversion than that performed with catalyst addition.

The AQ shows insolubility in aqueous solution, which complicates the path to reach the carbohydrates inside the lignocellulosic materials. According to the literature, diffusion is the main point of delignification and anthraquinone action in the cell wall and the intercell pits of the material. In the presence of alkali occurs a fiber swelling, where diffusion characteristics of the material are greatly improved.[26]

Anthraquinone has been shown to operate in a redox cycle during the delignification process of wood chips in pulp and paper process.[41] Carbohydrates dissolved in the pulping liquor and the reducing end groups of carbohydrates (which are oxidized to form aldonic acid groups) reduce the AQ to anthrahydroquinone (AHQ). It then reduces lignin quinone methides to cleave a $\beta$-aryl ether bond in the lignin.[42−44]

AQ cannot diffuse into the fibers; but when it is reduced, the AHQ becomes soluble in pulping liquor, allowing for diffusion. However, there is also oxidation during the cook, and AQ deposits out of solution. So, the only diffusing species is anthrahydroquinone (AHQ).

Therefore, it was suggested that the redox cycle during alkaline cooking takes two pathways, between AQ and AHQ$^-$ and between AHQ$^-$ and AQ. If the adduct mechanism is occurring, then the deposition of AQ is expected.[44]

Depending on how the pulping conditions are designed (temperature and time), the rate of AQ penetration, the AQ concentration in wood chips, and the reaction rate with lignin can be greatly varied.

On the basis of the premise that enzymatic hydrolysis of cellulose is a surface reaction, the diffusion is an equal important factor, as many others as pore volume, accessibility and residual lignin−carbohydrate chains content.[45]

Assuming the relationship between cellulose conversion and time, the kinetics can be similarly described as a Langmuir isothermal-type equation[46] (eq 4), which can also be expressed as eq 5.

$$EC = abt/(1 + bt) \quad (4)$$

$$t/EC = 1/ab + t/a \quad (5)$$

Where EC is enzymatic conversion, $a$ is capacity for the enzymatic hydrolysis of cellulose, $b$ is rate constant and $t$ is hydrolysis time.

The regression results are listed in Table 6. The linear correlation expressed as a Langmuir equation [$t/EC = 1/ab + t/a$] can be found in Figure S2 of the Supporting Information.

**Table 6. Kinetic Parameters for the Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Pretreated with and without Anthraquinone Addition**[a]

| sample | severity factor | $a$ | $b$ ($\times 10^2$) | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|
| 5Pil $W_{AQ}$ | 2.52 | 74.6 | 16.5 | 0.979 |
| 5Pil AQ | 2.59 | 71.9 | 16.6 | 0.982 |
| 7 Pil $W_{AQ}$ | 3.74 | 76.3 | 13.4 | 0.974 |
| 7 Pil AQ | 3.72 | 58.5 | 13.2 | 0.978 |

[a]Linear correlation. Pil $W_{AQ}$, pretreatment in pilot scale without anthraquinone addition; Pil AQ, pretreatment in pilot scale with anthraquinone addition.

According to Table 6, the kinetic parameter increased almost 23% in the cellulose conversion for the material pretreated without anthraquinone in condition 7 and 3.6% for the material pretreated without anthraquinone in a smaller severity factor. The rate constant $b$ does not have a fixed trend.

The second-generation ethanol production requires the most profitable condition that leads to high glucose content for the following fermentation step. Considering the pretreatment mass yield and enzymatic conversion the condition 130 °C, 30 min, 1.5% (w/v) was chosen in order to produce 293 kg of glucose from 1 ton of raw sugarcane bagasse.

Higher environmental impacts in second-generation ethanol scenarios are mainly related to high NaOH consumption for pretreatment, being the most impacting parameter in the global warming potential (GWP). However, through technological improvements, such as NaOH recycling, it is possible to select the alkaline pretreatment as a potential candidate for second-generation ethanol production.[47,48]

## ■ CONCLUSION

Anthraquinone is an interesting additive as an enhancer of lignin removal and cellulose preservation in the pulp and paper industry and also can be applied in pretreatment of sugarcane bagasse for second-generation ethanol production under mild conditions, namely 130 °C.

The scale-up showed good reproducibility, considering the most efficient heating system and agitation of pilot scale in relation to laboratory scale.

The AQ addition (130 °C, 30 min, 1.5% (w/v) NaOH + 0.15 (w/w) AQ) improved the carbohydrate yield, maximized lignin removal and could yield 293 kg of glucose from 1 ton of raw sugarcane bagasse, which can be used in generating ethanol through fermentation.



DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b01433
ACS Sustainable Chem. Eng. 2016, 4, 3609−3617

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b01433.

Table S1, scaled regression coefficients of the regression model; Figure SI, enzymatic conversion of cellulose versus time; Figure SII, linear correlation expressed as a Langmuir equation [$t/EC = 1/ab + t/a$] (PDF).

## ■ AUTHOR INFORMATION


### Corresponding Author

*G. J. M. Rocha. E-mail: george@debiq.eel.usp.br.


### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Fapesp (project 2010/51309-3) for financial support.

## ■ REFERENCES


(1) Soccol, C. R.; Vandenberghe, L. P. S.; Medeiros, A. B. P.; Karp, S. G.; Buckeridge, M.; Ramos, L. P.; Pitarelo, A. P.; Ferreira-Leitão, V.; Gottschalk, L. M. F.; Ferrara, M. A.; Bom, E. P. S.; Moraes, L. M. P. M.; Araújo, J. A.; Torres, F.A.G.; et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4820−4825.

(2) CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). *Acomp. safra bras. cana*, v. 2 - Safra 2015/16, n. 3 - terceiro levantamento, Brasília, p 1−65, December 2015. Available from: http://www.conab.gov.br.

(3) Cortez, L. A. B., Lora, E. E. S., Gómez, E. O. *Biomassa para Bioenergia*; UNICAMP: Campinas, Brazil, 2008.

(4) Quintero, J. A.; Montoya, M. I.; Sánchez, O. J.; Giraldo, O. H.; Cardona, C. A. Fuel ethanol production from sugarcane and corn: comparative analysis for a Colombian case. *Energy* **2008**, *33*, 385−399.

(5) Cardona, C. A.; Quintero, J. A.; Paz, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 4754−4766.

(6) Hongzhang, C.; Junying, Z. Clean production technology of integrated pretreatment for Lignocellulose. *Afr. J. of Agric. Res.* **2013**, *8* (4), 339−348.

(7) Xu, Z.; Huang, F. Pre-treatment Methods for Bioethanol Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *174*, 43−62.

(8) Sims, R. R. H.; Mabee, W.; Saddler, J. N.; Taylor, M. An overview of second generation biofuels technologies. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (6), 1570−1580.

(9) Zheng, Y.; Pan, Z.; Zhang, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* **2009**, *2* (3), 51−68.

(10) Brodeur, G.; Yau, E.; Badal, K.; Collier, J.; Ramachandran, K. B.; Ramakrishnan, S. Chemical and Physico-Chemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Res.* **2011**, *2011*, 1−17.

(11) Khristova, P.; Kordsachia, O.; Patt, R.; Dafaalla, S. Alkaline pulping of some eucalypts from Sudan. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 535−544.

(12) Rencoret, J.; Marques, G.; Gutiérrez, A.; Jiménez-Barbero, J.; Martínez, A. T.; del Río, J. C. Structural Modifications of Residual Lignins from Sisal and Flax Pulps during Soda-AQ Pulping and TCF/ECF Bleaching. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, *52*, 4695−4703.

(13) Barakat, A.; Chuetor, S.; Monlau, F.; Solhy, A.; Rouau, X. Eco-friendly dry chemo mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: Impact on energy and yield of the enzymatic hydrolysis. *Appl. Energy* **2014**, *113*, 97−105.

(14) Dias, M.; Cavalett, O.; Maciel, F. R.; Bonomi, A. Integrated first and second-generation ethanol production from sugarcane. *Chem. Eng. Trans.* **2014**, *37*, 445−450.

(15) Gouveia, E. R.; Nascimento, R. T.; Souto-Maior, A. M.; Rocha, G. J. M. Validation of methodology for the chemical characterization of sugar cane bagasse. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1500−1503.

(16) Martín, C.; López, Y.; Plasencia, Y.; Hernández, E. Characterization of agricultural and agro-industrial residues as raw materials for ethanol production. *Chem. Biochem. Eng. Quart.* **2006**, *20*, 443−446.

(17) Rocha, G. J. M., Gonçalves, A. R., Oliveira, B. R., Olivares, E., Rossel, C. E. V. Compositional variability of raw, steam-exploded and delignified sugarcane bagasse. In: *Proceedings of International Congress on Distributed Generation and Energy in Rural Media-AGRENER 2010*, December 2010, Campinas, S.P., Brazil. Available at: http://www.nipeunicamp.org.br/agrener/.

(18) Rocha, G. J. M.; Martín, C.; Soares, I. B.; Souto Maior, A. M.; Baudel, H. M.; Abreu, C. A. M. Dilute mixed-acid pre-treatment of sugarcane straw for ethanol production. *Biomass Bioenergy* **2011**, *35*, 663−670.

(19) Rocha, G. J. M.; Gonçalves, A. R.; Olivares, E. G.; Rossell, C. E. V.; Oliveira, B. R. Steam explosion pre-treatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.* **2012**, *35*, 274−279.

(20) Sanjuán, R.; Anzaldo, J.; Vargas, J.; Turrado, J.; Patt, R. Morphological and chemical composition of pith and fibers from Mexican sugarcane bagasse. *Holz Roh Werkst.* **2001**, *59*, 447−450.

(21) Rocha, G. J. M.; Nascimento, V. M.; Gonçalves, A. R.; Silva, V. F. N.; Martín, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical−chemical composition. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *64*, 52−58.

(22) Arantes, T. A. Uso de soluções hidrotópicas na deslignificação do bagaço de cana de açúcar. Ph.D. Dissertation, Instituto de química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2009.

(23) Rennie, E. A.; Scheller, H. V. Xylan biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *26*, 100−107.

(24) Balakshin, M.; Capanema, E.; Gracz, H.; Chang, H-m.; Jameel, H. Quantification of lignin−carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy. *Planta* **2011**, *233*, 1097−1110.

(25) Imamura, T.; Watanabe, T.; Kuwahara, M.; Koshijima, T. Ester linkages between lignin and glucuronic acid in lignin− carbohydrate complexes from Fagus crenata. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1165−1173.

(26) Fengel, D., Wegener, G. *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*; Walter de Gruyter: Berlin, 1989.

(27) McDougall, G. J.; Morrison, I. M.; Stewart, D.; Weyers, J. D. B.; Hillman, J. R. Plant Fibres: Botany, Chemistry and Processing for Industrial Use. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *62*, 1−20.

(28) Rocha, G. J. M. Deslignificacão de bagaço de cana-de-açúcar assistida por oxigênio. PhD. Thesis, Universidade de São Paulo/Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, Brazil, 2000.

(29) Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3rd ed.; Academic Press: Boston, MA, 1990.

(30) Yu, P. H.; Block, Z.; Niu, K.; Doiron, K. Rapid Characterization of Molecular Chemistry, Nutrient make-up and Microlocation of Internal Seed Tissue. *J. Synchrotron Radiat.* **2007**, *14*, 382−390.

(31) Li, C.; Tanjore, D.; He, W.; Wong, J.; Gardner, J. L.; Sale, K. L.; Simmons, B. A.; Singh, S. Scale-up and evaluation of high solid ionic liquid pretreatment and enzymatic hydrolysis of switchgrass. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6*, 154.

(32) Palmqvist, B.; Lîden, G. Torque measurements reveal large process differences between materials during high solid enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulose. *Biotechnol. Biofuels* **2012**, *5*, 57.

(33) Chen, Y.; Stevens, M. A.; Zhu, Y.; Holmes, J.; Xu, H. Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnol. Biofuels* **2013**, *6* (8), 1−10.

(34) Hsu, T.; Himmel, M.; Schell, D.; Farmer, J. Berggren. Design and Initial Operation of a High-Solids, Pilot-Scale Reactor for Dilute-Acid Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, *57*, 58.

(35) Hart, P. W.; Rudie, A. W. Anthraquinone − A Review of the Rise and Fall of a Pulping Catalyst. *Proceedings of the TAPPI PEERS*

*Conference*, Tacoma, WA, September 14−17, 2014; Preprint 24-1, TAPPI PRESS: Atlanta, GA, 2014.

(36) Lee, H. V.; Hamid, S. B. A.; Zain, S. K. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, 1−20.

(37) Renard, J. J.; Phillips, R. B. Analysis of anthraquinone impact on alkaline pulping processes; AIChE Symposium Series 200; 1980; Vol. *76*, pp 182−189.

(38) Wang, Y.; Azhar, S.; Lindström, M.; Henriksson, G. Stabilization of polysaccharides during alkaline pretreatment of wood combined with enzyme supported extractions in a biorefinery. *J. Wood Chem. Technol.* **2015**, *35* (2), 91−101.

(39) Joshi, B.; Bhatt, M. R.; Sharma, D. Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **2011**, *6* (8), 172−182.

(40) Iranmahboob, J.; Nadim, F.; Monemi, S. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. *Biomass Bioenergy* **2002**, *22* (5), 401−404.

(41) Fleming, B. I.; Kubes, G. J.; Macleod, J. M.; Bolker, H. I. Polarographic Analysis of Soda-Anthraquinone Pulping Liquor. *TAPPI* **1979**, *62* (7), 55.

(42) Fullerton, T. J. Soda-Anthraquinone Pulping: The Advantages of Using Oxygen-Free Conditions. *TAPPI* **1979**, *62* (8), 55.

(43) Ringley, M. B. Westvaco uses anthraquinone to increase alkaline pulp yields. *Am. Papermaker* **1991**, *54* (4), 52−53.

(44) Samp, J. C. A comprehensive mechanism for anthraquinone mass transfer in alkaline pulping. Ph.D. Dissertation, Georgia Institute of Technology, Atlanta, GA, 2008.

(45) Yang, B.; Dai, Z.; Ding, S.-Y.; Wyman, C. E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels* **2011**, *2* (4), 421−450.

(46) Chen, K.; Xu, L.; Bi, Z.; Fu, Z. Kinetics analysis of the enzymatic hydrolysis of cellulose from straw stalk. *Chin. J. Geochem.* **2013**, *32*, 41−46.

(47) Dias, M. O. S.; Junqueira, M. O. S.; Cavalett, T. L.; Cunha, M. P.; Jesus, C. D.F.; Rossell, C. E.V.; Filho, R. M.; Bonomi, A. Integrated versus stand-alone second-generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresour. Technol.* **2012**, *103*, 152−161.

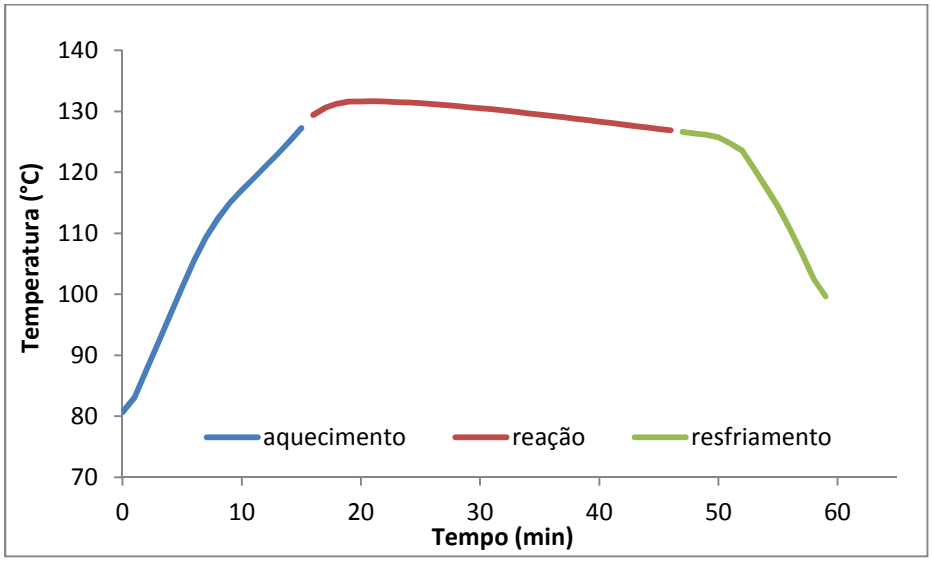
(48) Rocha, G. J. M.; Nascimento, V. M.; Silva, V. F. N.; Corso, D. L.S.; Gonçalves, A. R. Contributing to the environmental sustainability of the second-generation ethanol production: Delignification of sugarcane bagasse with sodium hydroxide recycling. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *59*, 63−68.



DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b01433
*ACS Sustainable Chem. Eng.* 2016, 4, 3609−3617

**Apêndice B**. Rampas de aquecimento e resfriamento e severidade da reação.

**Reação 5 Pil/SAQ (130°C, 30 min, 1,5%(m/v) NaOH)**



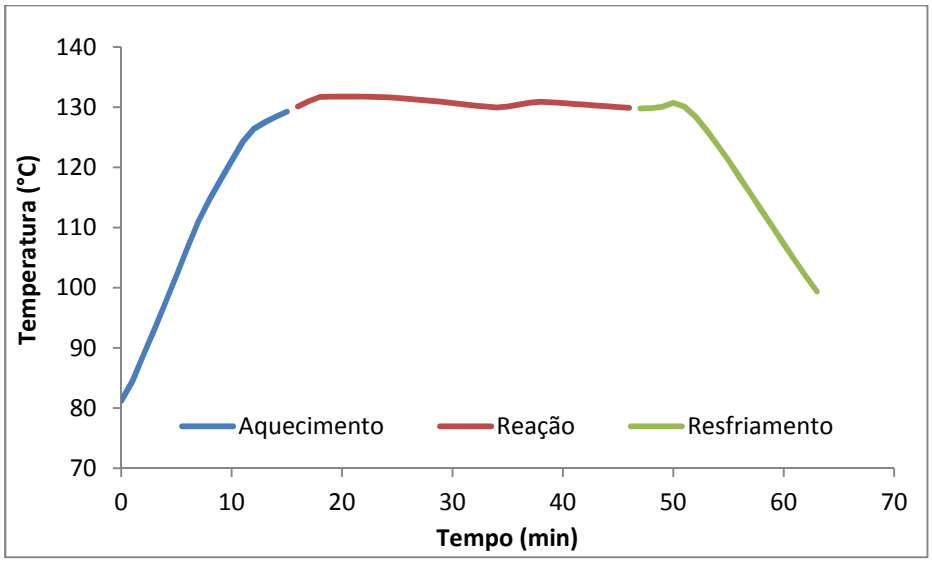

$t_{aquecimento}$ = 15 min

$t_{resfriamento}$ = 12 min

$T_{média\ durante\ a\ reação}$ = (129,8 + 1,5)°C

Severidade = 2,52

**Reação 5 Pil/AQ (130°C, 30 min, 1,5%(m/v) NaOH + 0,15%(m/m) AQ)**



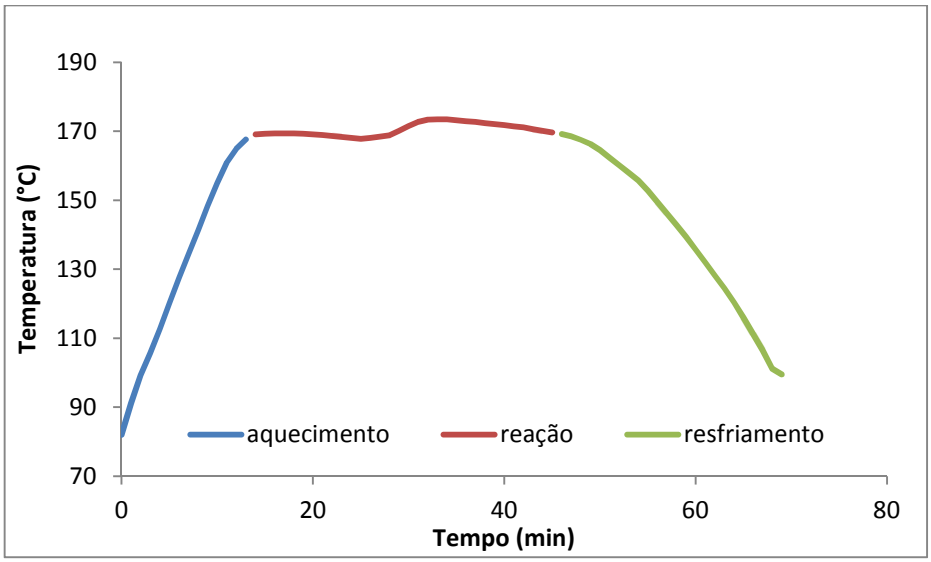

$t_{aquecimento}$ = 15 min

$t_{resfriamento}$ = 16 min

$T_{média\ durante\ a\ reação}$ = (130,8 + 0,6)°C

Severidade = 2,59

**Reação 7 Pil/SAQ (170°C, 30 min, 1,5%(m/v) NaOH)**



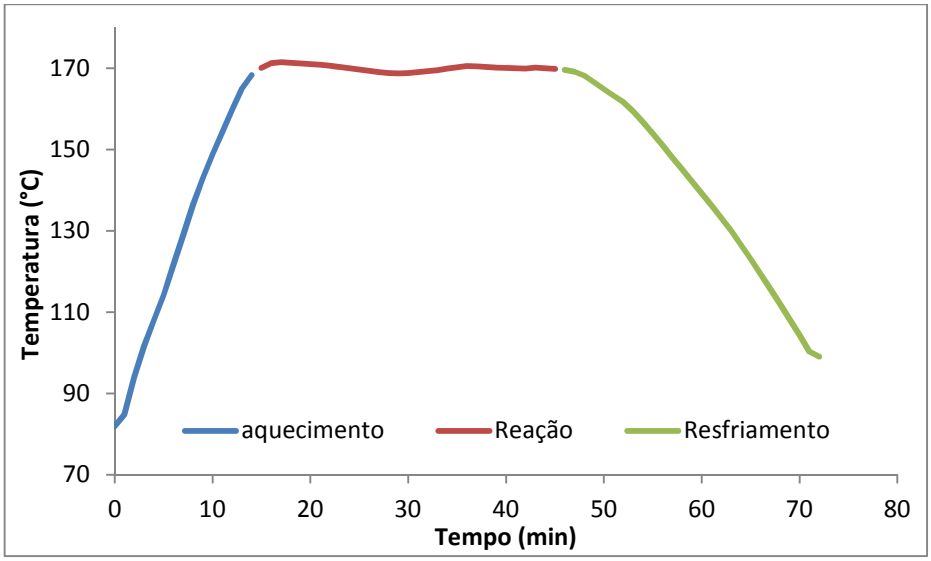

$t_{aquecimento}$ = 14 min

$t\ r_{esfriamento}$ = 24 min

$T_{média\ durante\ a\ reação}$ = (170,5 + 1,9)°C

Severidade = 3,74

**Reação 7 Pil/AQ (170°C, 30 min, 1,5%(m/v) NaOH + 0,15%(m/m) AQ)**




$t_{aquecimento}$ = 14 min

$t_{resfriamento}$ = 26 min

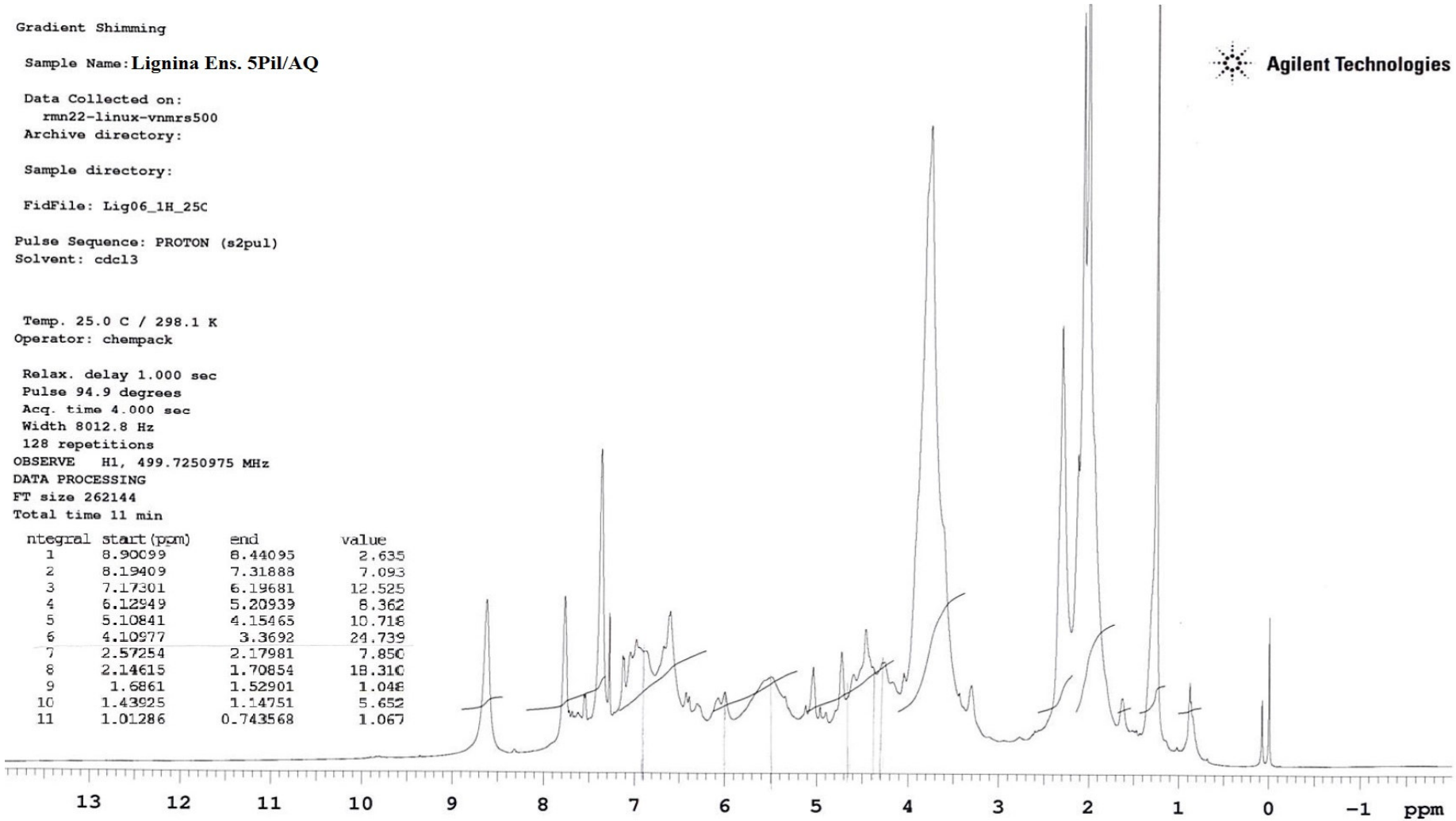
$T_{média\ durante\ a\ reação}$ = (170,0 + 0,8)°C

Severidade = 3,72

**Apêndice C.** Valores de absorbância para as principais bandas identificadas no espectro de infravermelho.

| Posição da banda | In natura | Avicel | Ens 5 Pil/SAQ | | Ens 7 Pil/SAQ | | Ens 5 Pil/AQ | | Ens 7 Pil/AQ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | A | B | A | B | A | B | A | B |
| 3337 | 0,278 | 0,354 | 0,281 | 0,270 | 0,285 | 0,270 | 0,259 | 0,303 | 0,283 | 0,282 |
| 2900 | 0,141 | 0,151 | 0,138 | 0,130 | 0,129 | 0,131 | 0,124 | 0,130 | 0,130 | 0,131 |
| 1604 | 0,135 | 0,027 | 0,041 | 0,034 | 0,029 | 0,032 | 0,037 | 0,039 | 0,029 | 0,031 |
| 1510 | 0,063 | 0,000 | 0,006 | 0,008 | 0,001 | 0,001 | 0,003 | 0,005 | 0,000 | 0,000 |
| 1261 | 0,183 | 0,058 | 0,058 | 0,059 | 0,053 | 0,050 | 0,056 | 0,057 | 0,051 | 0,056 |
| 1246 | 0,222 | 0,048 | 0,050 | 0,051 | 0,046 | 0,043 | 0,048 | 0,048 | 0,044 | 0,048 |
| 1106 | 0,454 | 0,484 | 0,445 | 0,443 | 0,425 | 0,457 | 0,437 | 0,427 | 0,432 | 0,434 |
| 1091 | 0,487 | 0,393 | 0,466 | 0,481 | 0,446 | 0,471 | 0,477 | 0,439 | 0,450 | 0,445 |
| 897 | 0,106 | 0,139 | 0,169 | 0,170 | 0,158 | 0,174 | 0,159 | 0,149 | 0,163 | 0,162 |

**Apêndice D.** Espectros de RMN de $^{1}H$ para as ligninas obtidas nas diferentes condições.




| ntegral | start (ppm) | end | value |
|---|---|---|---|
| 1 | 8.90099 | 8.44095 | 2.635 |
| 2 | 8.19409 | 7.31888 | 7.093 |
| 3 | 7.17301 | 6.19681 | 12.525 |
| 4 | 6.12949 | 5.20939 | 8.362 |
| 5 | 5.10841 | 4.15465 | 10.718 |
| 6 | 4.10977 | 3.3692 | 24.739 |
| 7 | 2.57254 | 2.17981 | 7.850 |
| 8 | 2.14615 | 1.70854 | 18.310 |
| 9 | 1.6861 | 1.52901 | 1.048 |
| 10 | 1.43925 | 1.14751 | 5.652 |
| 11 | 1.01286 | 0.743568 | 1.067 |

Gradient Shimming

Sample Name: **Lignina Ens. 5 Pil/ SAQ**

Data Collected on:
rmn22-linux-vnmrs500
Archive directory:

Sample directory:

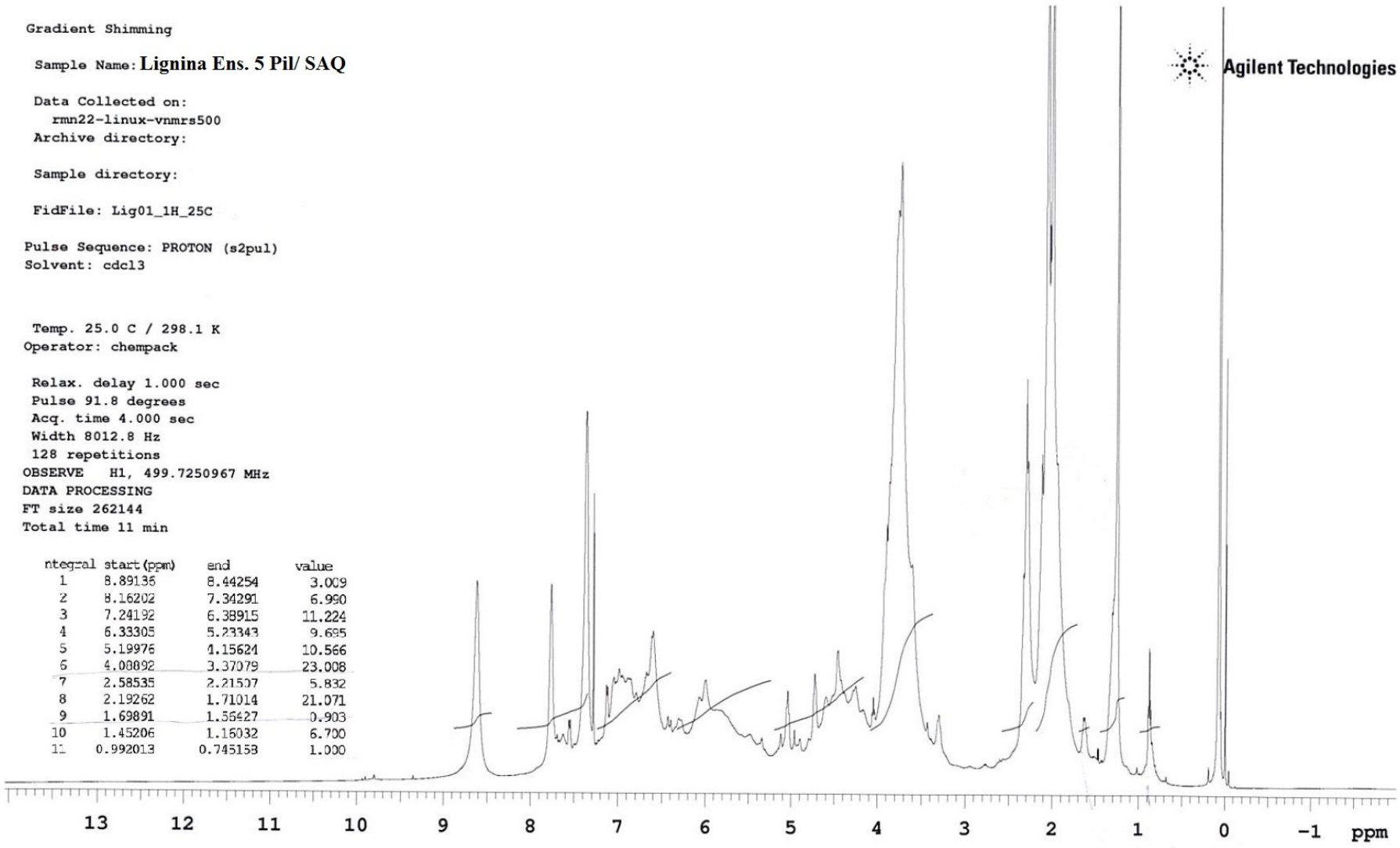
FidFile: Lig01_1H_25C

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 91.8 degrees
Acq. time 4.000 sec
Width 8012.8 Hz
128 repetitions
OBSERVE H1, 499.7250967 MHz
DATA PROCESSING
FT size 262144
Total time 11 min

| ntegral | start (ppm) | end | value |
|---|---|---|---|
| 1 | 8.89135 | 8.44254 | 3.009 |
| 2 | 8.16202 | 7.34291 | 6.990 |
| 3 | 7.24192 | 6.38915 | 11.224 |
| 4 | 6.33305 | 5.23343 | 9.695 |
| 5 | 5.19976 | 4.15624 | 10.566 |
| 6 | 4.08892 | 3.37079 | 23.008 |
| 7 | 2.58535 | 2.21507 | 5.832 |
| 8 | 2.19262 | 1.71014 | 21.071 |
| 9 | 1.69891 | 1.56427 | 0.903 |
| 10 | 1.45206 | 1.16032 | 6.700 |
| 11 | 0.992013 | 0.745158 | 1.000 |



Gradient Shimming

Sample Name: **Lignina Ens. 7Pil/ AQ**

Data Collected on:
rmn22-linux-vnmrs500
Archive directory:

Sample directory:

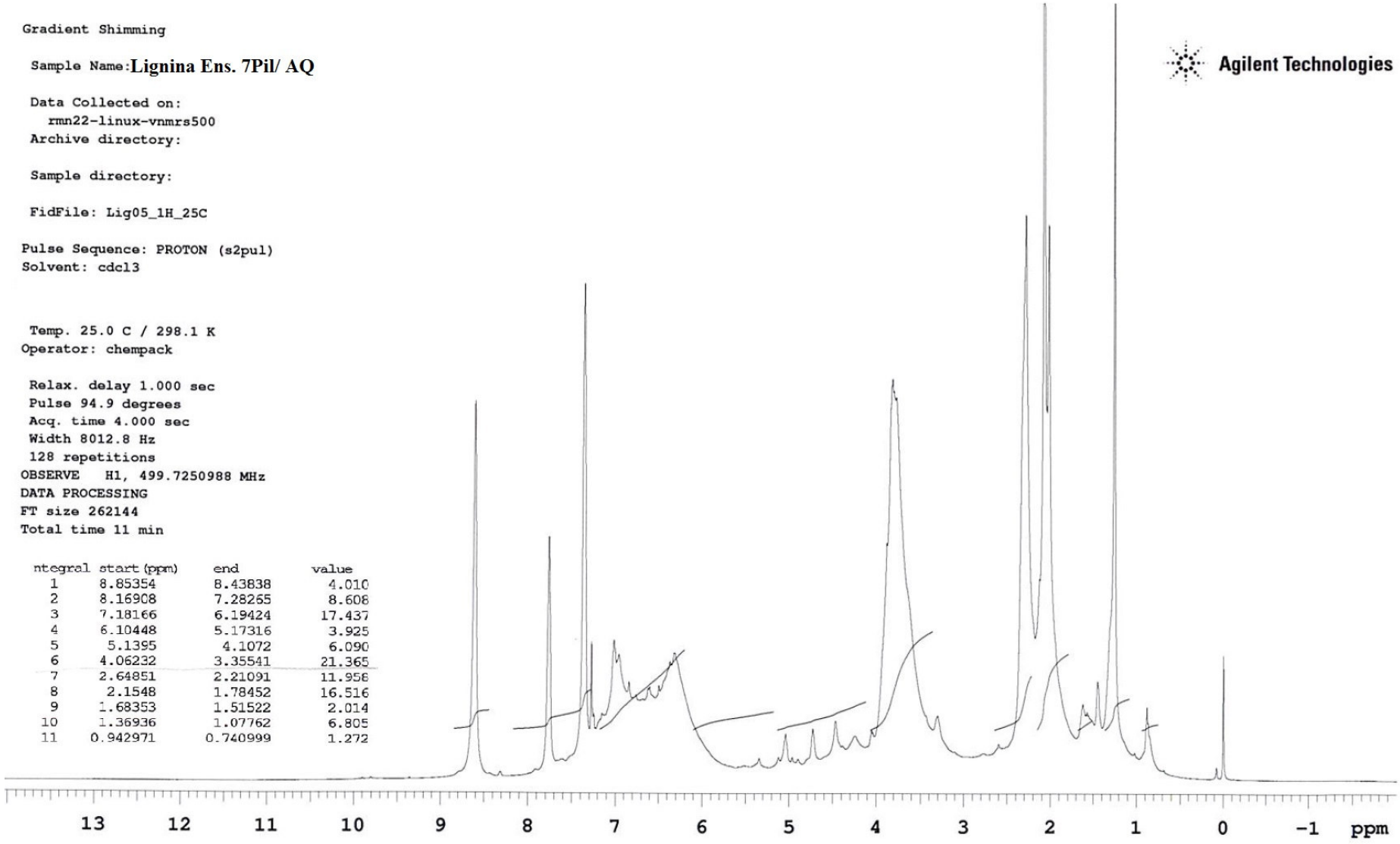
FidFile: Lig05_1H_25C

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 94.9 degrees
Acq. time 4.000 sec
Width 8012.8 Hz
128 repetitions
OBSERVE H1, 499.7250988 MHz
DATA PROCESSING
FT size 262144
Total time 11 min

| ntegral | start (ppm) | end | value |
|---|---|---|---|
| 1 | 8.85354 | 8.43838 | 4.010 |
| 2 | 8.16908 | 7.28265 | 8.608 |
| 3 | 7.18166 | 6.19424 | 17.437 |
| 4 | 6.10448 | 5.17316 | 3.925 |
| 5 | 5.1395 | 4.1072 | 6.090 |
| 6 | 4.06232 | 3.35541 | 21.365 |
| 7 | 2.64851 | 2.21091 | 11.956 |
| 8 | 2.1548 | 1.78452 | 16.516 |
| 9 | 1.68353 | 1.51522 | 2.014 |
| 10 | 1.36936 | 1.07762 | 6.805 |
| 11 | 0.942971 | 0.740999 | 1.272 |



Gradient Shimming

Sample Name: **Lignina Ens. 7 Pil/ SAQ**

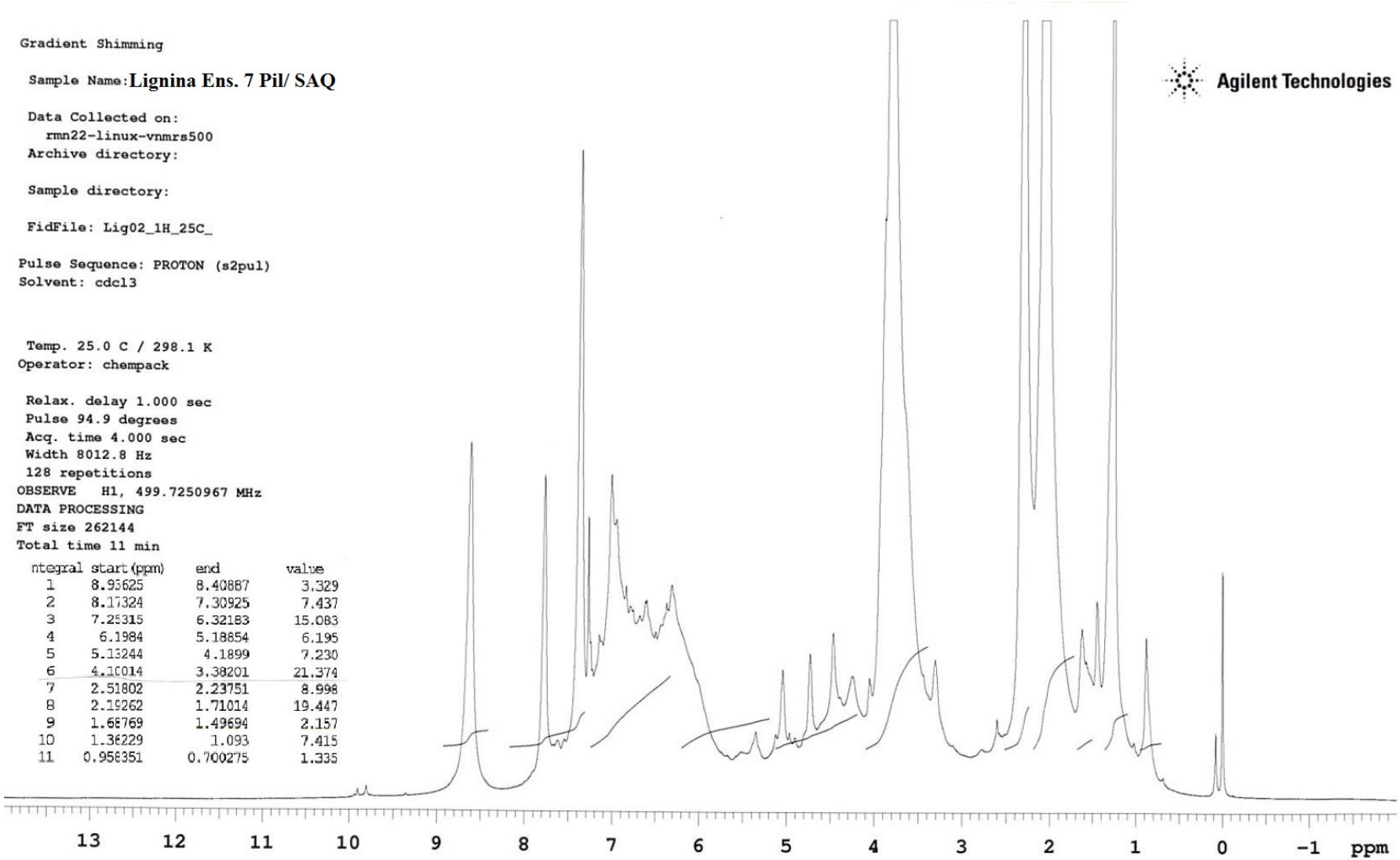
Data Collected on:
rmn22-linux-vnmrs500
Archive directory:

Sample directory:

FidFile: Lig02_1H_25C_

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 94.9 degrees
Acq. time 4.000 sec
Width 8012.8 Hz
128 repetitions
OBSERVE H1, 499.7250967 MHz
DATA PROCESSING
FT size 262144
Total time 11 min

| ntegral | start (ppm) | end | value |
|---|---|---|---|
| 1 | 8.93625 | 8.40887 | 3.329 |
| 2 | 8.17324 | 7.30925 | 7.437 |
| 3 | 7.25315 | 6.32183 | 15.083 |
| 4 | 6.1984 | 5.18854 | 6.195 |
| 5 | 5.13244 | 4.1899 | 7.230 |
| 6 | 4.10014 | 3.38201 | 21.374 |
| 7 | 2.51802 | 2.23751 | 8.998 |
| 8 | 2.19262 | 1.71014 | 19.447 |
| 9 | 1.68769 | 1.49694 | 2.157 |
| 10 | 1.36229 | 1.093 | 7.415 |
| 11 | 0.958351 | 0.700275 | 1.335 |