UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

PAULA JULIÃO ESTEVES

**Estudo de uma concepção de processo simplificado para a conversão
simultânea dos açúcares do bagaço de cana em etanol**

Lorena
2015

PAULA JULIÃO ESTEVES

**Estudo de uma concepção de processo simplificado para a conversão
simultânea dos açúcares do bagaço de cana em etanol**

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

Orientador: Prof. Dr. Walter de Carvalho

Edição reimpressa e corrigida

Lorena
Agosto, 2015

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

Esteves, Paula Julião

Estudo de uma concepção de processo simplificado para a conversão simultânea dos açúcares do bagaço de cana em etanol / Paula Julião Esteves; orientador Walter Carvalho - ed. reimp., corr. - Lorena, 2015. 124 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. 2015
Orientador: Walter Carvalho

1. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Ácido sulfúrico diluído. 3. Celulases. 4. Scheffersomyces stipitis . 5. Integração entre pré-tratamento, sacarificação e fermentação. I. Título. II. Carvalho, Walter, orient.

*Aos meus amados pais, Renato e
Cecília pelo exemplo, incentivo, apoio
e conforto nos momentos difíceis.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Walter de Carvalho, pela orientação e dedicação durante todo o período de trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Biotecnologia, em especial, Zé Carlos, Zé Moreira, Paulinho, André e Lucinha, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos professores Adriane Maria Ferreira Milagres e André Ferraz pelos ensinamentos e infraestrutura de laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia, Joseana, Felipe, Guilherme, Luciane, Maiara, Dani e outros tantos que passaram pouco ou muito tempo no laboratório ao longo destes anos de trabalho, pela amizade e bons momentos de convivência. Em especial, à minha dupla querida, Cecéu e Germano, que além de terem me ajudado imensamente no trabalho, me fizeram rir o tempo todo e sempre estiveram ao meu lado.

Aos demais amigos de Departamento pelos momentos de descontração e cumplicidade, em especial ao Bruno Guedes, pela amizade sincera de tantos anos, por todas as sugestões e conversas.

Aos meus pais, Renato e Cecília, e irmã, Mari, pelo apoio e valores que eu vou levar para sempre.

Às queridas amigas de infância, Mariana, Mariane, Eni, Didi e Júlia, que sempre estiveram presentes, pelo companheirismo e torcida.

Ao meu amor e melhor amigo, Leonardo Marques, que, sem nunca questionar as minhas decisões, me apoiou inteiramente, compreendeu minha ausência por muitas vezes, pela paciência, amor e carinho.

À EEL/USP.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

*“Nem sempre a simplicidade é a
perfeição, mas a perfeição quase
sempre é simples”.*

Willian de Ockhan

RESUMO

ESTEVEES, P.J. **Estudo de uma concepção de processo simplificado para a conversão simultânea dos açúcares do bagaço de cana em etanol**. 2015. 124p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – Lorena, 2015.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a conversão dos açúcares do bagaço de cana em etanol, com foco na integração entre o pré-tratamento com H_2SO_4 diluído, sacarificação com celulasas comerciais e fermentação com *Scheffersomyces stipitis* DSM-3651, buscando-se uma configuração simplificada. Previamente aos ensaios de integração, o bagaço foi moído para a redução de sua heterogeneidade granulométrica. Após a moagem, o bagaço foi submetido a fracionamento, por fluxo de ar, separando frações de fibras e finos. Estas frações foram submetidas a análise composicional e observou-se que a fração de finos possui elevados teores de cinzas e extrativos, além de baixo teor de lignina em relação à fração de fibras, entretanto a estratégia de fracionamento do bagaço não foi seletiva. Os experimentos de definição da condição de pré-tratamento mais adequada para a avaliação entre integração entre sacarificação e fermentação foram conduzidos em reator Parr (2 gal) com 2Kg de mistura reacional, incluindo bagaço (10%), água e ácido. Três condições operacionais de pré-tratamento foram avaliadas: $140^\circ\text{C}/1\%\text{H}_2\text{SO}_4/20$ min, $150^\circ\text{C}/2\%\text{H}_2\text{SO}_4/30$ min e $160^\circ\text{C}/3\%\text{H}_2\text{SO}_4/40$ min. Após o pré-tratamento, o *slurry* foi separado em sólido pré-tratado e hidrolisado hemicelulósico, por filtração. Em seguida o bagaço pré-tratado foi lavado exaustivamente com água destilada e submetido à hidrólise enzimática com celulasas (10 FPU/g bagaço) por 72h. Paralelamente, o hidrolisado foi submetido à fermentação com *S. stipitis* (3 g/L) por 120h. As composições das frações geradas após o pré-tratamento (bagaço pré-tratado, hidrolisado e água de lavagem), quanto aos teores de açúcares e sólidos (solúveis e insolúveis) foram determinadas. As três condições de pré-tratamento levaram a remoção completa de hemicelulose do bagaço, e o aumento da severidade do pré-tratamento acarretou em aumento da eficiência de sacarificação dos sólidos pré-tratados, porém em menor recuperação de glicose após hidrólise enzimática. Por outro lado, o aumento da severidade do pré-tratamento prejudicou a recuperação de açúcares no hidrolisado hemicelulósico, elevando concentrações de ácido acético, furfural e HMF, resultando em inibição completa de fermentação daqueles obtidos nas condições de 150°C e 160°C . A conversão do sólido pré-tratado (lavado ou não-lavado) + hidrolisado (destoxificado ou não), e do *slurry* completo (destoxificado ou não) ambos obtidos após pré-tratamento à 140°C , foi avaliada em duas configurações, respectivamente: “Fermentação do hidrolisado hemicelulósico (FHH), em separado da sacarificação do sólido pré-tratado e da fermentação do hidrolisado celulósico, separadas (SHF)” e “Sacarificação do sólido pré-tratado, em separado da co-fermentação dos hidrolisados celulósico e hemicelulósico, integradas (ISHCF)”. Na primeira, observou-se que a destoxificação do hidrolisado com lacase (1U/mL) aumentou a produção de etanol, e possibilitou a redução do tempo de conversão em 48h. A sacarificação de sólidos não-lavados foi prejudicada pela presença de compostos solúveis e o condicionamento com lacase não influenciou a eficiência de sacarificação. A eficiência máxima de conversão em configuração de SHF+FHH foi de 28,4%, devido a não lavagem do sólido pré-tratado (13,7%) e destoxificação do HH (14,7%). Em ISHCF, observou-se que a eficiência de conversão de *slurry* integral destoxificado com lacase é mais alta (38,9%) do que em SHF+FHH, devido a não separação sólido-líquido e maior disponibilidade de açúcares.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar; Ácido sulfúrico diluído; Celulasas; *Scheffersomyces stipitis*; Integração entre pré-tratamento, sacarificação e fermentação.

ABSTRACT

ESTEVEES, P.J. **Study of a simplified design process for simultaneous conversion of sugars from bagasse in ethanol.** 2015. 124p. Thesis (Doctor in Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – Lorena, 2015.

This study aimed to evaluate the conversion of sugarcane bagasse into ethanol, focusing on integration between pretreatment with dilute H_2SO_4 , saccharification with commercial cellulases and fermentation with *Scheffersomyces stipitis* DSM-3651, in a simplified design process. Prior to integration assays, the bagasse was milled to reduce its granulometric heterogeneity. After milling, the fractions of bagasse (fiber and pith) were separated by air flow. These fractions had their chemical composition determined and it was observed that pith fraction has higher content of ash, soluble extractives and low lignin content than fiber fraction; however the separation method was not selective. The experiments to define the most suitable pretreatment condition for evaluating the integration between saccharification and fermentation were conducted in a Parr reactor (2 gal) with 2 kg of reaction mixture, including bagasse (10%), water and acid. Three operational conditions of pretreatment were evaluated: 140°C/1% H_2SO_4 /20min, 150°C/2% H_2SO_4 /30 min and 160°C/3% H_2SO_4 /40min. After pretreatment, the slurry was separated in pretreated solid and hemicellulosic hydrolyzate, by filtration. The pretreated solid was thoroughly washed with distilled water and submitted to enzymatic hydrolysis with cellulases (10 FPU / g residue) for 72h. In parallel, the hemicellulosic hydrolyzate was submitted to fermentation with *S. stipitis* (3 g / L) for 120h. The compositions of the fractions generated after pretreatment (pretreated bagasse, hemicellulosic hydrolyzate and washing water), regarding sugars and solids (soluble and insoluble) contents were determined. All pretreatment conditions led to complete removal of hemicellulose from the bagasse, and the increase of pretreatment severity improved the saccharification yield of pretreated solid, but, led to low recovery of glucose after enzymatic hydrolysis. On the other hand, the increase of pretreatment severity impaired the recovery of sugars in hemicellulosic hydrolysate besides increasing the concentrations of acetic acid, furfural and HMF, resulting in complete inhibition of fermentation of those obtained under the pretreatment conditions of 150°C and 160°C. The conversion of pretreated solid (washed and non-washed) + hemicellulosic hydrolyzate (with or without detoxification) and of the whole slurry, both obtained at 140°C was evaluated in two process designs, respectively: "Fermentation of hemicellulosic hydrolyzate (FHH), separated from hydrolysis of pretreated solid and fermentation of cellulosic hydrolyzate, separately (SHF)" and "Integrated hydrolysis of pretreated solid separated from co-fermentation of cellulosic and hemicellulosic hydrolysates (ISHCF)". In the first, it was observed that the detoxification of the hydrolyzate with laccase (1U / ml) improved the ethanol production, particularly for conversion time. The saccharification of non-washed solid was hampered by the presence of soluble compounds and its conditioning treatment with laccase did not influence the saccharification yield. The maximum conversion efficiency in SHF + FHH configuration was 28.4% due to not washing the pretreated solid (13.7%) and detoxification of hemicellulosic hydrolysate (14.7%). In the second process design, it was observed that the conversion efficiency of whole slurry, with laccase detoxification, was higher (38.9%) than in the separate configuration, with a lower conversion time.

Keywords: Sugarcane bagasse; Dilute sulfuric acid; Cellulases; *Scheffersomyces stipitis*; Integration between pretreatment, saccharification and fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cadeia linear de celulose indicando a sua unidade conformacional, celobiose (A). Associação das cadeias de celulose formando a fibrila elementar (B) (RAMOS, 2003).....	22
Figura 2 - Estrutura de hemicelulose de gramínea (glucuronoarabinosilana) (EK et al. 2009).....	22
Figura 3 - Estruturas dos álcoois precursores da lignina (FENGEL; WEGENER, 1989).....	23
Figura 4 - Configurações de processo para a conversão de biomassas lignocelulósicas em etanol.....	29
Figura 5 - Visão geral (A), fundo (B) e perfil (C) da caixa utilizada para a remoção de finos por fluxo de ar.....	46
Figura 6 - Perfis de temperatura observados durante os pré-tratamentos do bagaço de cana com H ₂ SO ₄ diluído.....	51
Figura 7 - Distribuição granulométrica do bagaço de cana “A” integral e moído em moinho de martelo.....	63
Figura 8 - Distribuição granulométrica do bagaço de cana “A” moído em moinho de martelo sem finos e da fração de finos.....	65
Figura 9 - Perfil de absorção de luz por extratos aquosos e alcóolicos provenientes das frações do bagaço de cana “A” sem finos (A) e contendo apenas finos (B).....	66
Figura 10 - Distribuição granulométrica do bagaço de cana “B”, integral e moído em moinho de martelo.....	69
Figura 11 - Fotografias dos bagaços in natura (1) e pré-tratados a 140°C, 1% H ₂ SO ₄ , 20 min (2), 150°C, 2% H ₂ SO ₄ , 30 min (3) e 160°C, 3% H ₂ SO ₄ , 40 min (4).....	73
Figura 12 - Volumes cumulativos de água congelável (A) e áreas superficiais acessíveis (B) dos bagaços <i>in natura</i> e pré-tratados nas diferentes condições, determinados com base nas massas de água congelável. Massas de água não congelável: 140°C (0,26 g/g); 150°C (0,24 g/g); 160°C (0,15 g/g); in natura (0,22 g/g).....	74
Figura 13 - Difratoformas de raios-X dos bagaços de cana <i>in natura</i> e pré-tratados nas diferentes condições de pré-tratamento.....	75
Figura 14 - Rendimento de sacarificação enzimática dos sólidos pré-tratados nas diferentes condições de pré-tratamento (A) e concentração de glicose (B), em função do tempo de hidrólise.....	77

Figura 15 - Concentrações de xilose (A), células (B) e etanol (C) determinadas durante as fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos; não-destoxificado e destoxificados com lacase ou ditionito de sódio.....89

Figura 16 - Eficiências de sacarificação enzimática do sólido pré-tratado a 140 °C, lavado (SL) e não lavado (SNL), não condicionado (NC) e condicionado (C) com lacase (1 U/mL), em função do tempo de hidrólise.....91

Figura 17 - Concentrações de glicose, xilose, células e etanol determinadas durante as fermentações dos hidrolisados celulósicos; SL/NC (A); SNL/NC (B).....93

Figura 18 - Eficiência de sacarificação enzimática da glucana contida no sólido pré-tratado lavado (SL) (A) e produção de etanol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico (B), em diferentes combinações de temperatura e pH.....97

Figura 19 - Concentrações de glicose e xilose durante a sacarificação enzimática (A) e produção de etanol durante a fermentação (B), determinadas para os *slurries*; neutralizado, pré-suplementado, e destoxificado, em configuração híbrida e não híbrida.....99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis e parâmetros da conversão de materiais lignocelulósicos via SHF.....	32
Tabela 2 - Variáveis e parâmetros da conversão de materiais lignocelulósicos via SSF.....	33
Tabela 3 - Variáveis e parâmetros da conversão de materiais lignocelulósicos via SSCF.....	36
Tabela 4 - Variáveis e parâmetros da conversão de <i>slurries</i> integrais em etanol.....	39
Tabela 5 - Variáveis e parâmetros da destoxificação de hidrolisados para a fermentação alcoólica.....	43
Tabela 6 - Variáveis e parâmetros do condicionamento de sólidos pré-tratados para a hidrólise enzimática.....	45
Tabela 7 - Teores percentuais dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar “C” determinados na EEL/USP e valores atribuídos a cada componente pelo INMETRO.....	62
Tabela 8 - Composição química das frações do bagaço de cana “A” sem finos e contendo somente finos.....	67
Tabela 9 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar “B”, em comparação a valores reportados na literatura.....	70
Tabela 10 - Composição química dos sólidos pré-tratados obtidos nas diferentes condições de pré-tratamento.....	71
Tabela 11 - Composição e rendimento de sacarificação de sólidos pré-tratados obtidos em diferentes condições de pré-tratamento de bagaço de cana com H ₂ SO ₄ diluído (ESTEVES, 2011).....	78
Tabela 12 - Composição dos hidrolisados hemicelulósicos e das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados obtidos nas diferentes condições de pré-tratamento.....	79
Tabela 13 - Concentração, rendimento e produtividade determinados durante a fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos após os pré-tratamentos de bagaço de cana com H ₂ SO ₄ diluído.....	81
Tabela 14 - Balanço de massa para carboidratos recuperados nas frações obtidas após os pré-tratamentos do bagaço de cana com H ₂ SO ₄ diluído.....	82

Tabela 15 - Rendimento de recuperação de glicose, xilose e arabinose após o pré-tratamento com H ₂ SO ₄ diluído e a hidrólise enzimática.....	83
Tabela 16. Composição química dos sólidos pré-tratados a 140°C e 1% H ₂ SO ₄ por 20 min.....	84
Tabela 17 - Composição química dos hidrolisados hemicelulósicos e das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados, obtida após os pré-tratamentos do bagaço de cana a 140°C e 1% H ₂ SO ₄ por 20 min.....	85
Tabela 18 - Balanços de massa para diferentes componentes, determinados após os pré-tratamentos do bagaço de cana a 140°C e 1% H ₂ SO ₄ por 20 min.....	86
Tabela 19 - Rendimento de recuperação de glicose, xilose e arabinose após o pré-tratamento com H ₂ SO ₄ diluído e a hidrólise enzimática.....	87
Tabela 20 - Composição química dos hidrolisados hemicelulósicos, não-destoxificado e destoxificados com lacase e ditonito de sódio.....	88
Tabela 21. Produção (P _F), rendimento (Y _{p/s}), produtividade (Q _p) e eficiência determinados durante a fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos destoxificados e não destoxificado.....	90
Tabela 22 - Produção (P _F), rendimento (Y _{p/s}), produtividade (Q _p) e eficiência determinados durante a fermentação dos hidrolisados celulósicos obtidos após de HE partir de sólidos lavados (SL/NC) e não-lavados (SNL/NC).....	94
Tabela 23 – Eficiências de conversão dos açúcares do bagaço de cana por SHF de sólidos pré-tratados lavados e não lavados e fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos destoxificados e não destoxificados.....	95
Tabela 24 – Eficiências de conversão dos açúcares do bagaço de cana por SHF de <i>slurries</i> neutralizado, pré-suplementado e destoxificado com lacase.....	101

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Bagaço de cana-de-açúcar e materiais lignocelulósicos	21
2.1.1. Granulometria e condicionamento	24
2.1.2. Composição química e estrutura	24
2.2. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos	25
2.2.1. Pré-tratamento	26
2.2.2. Sacarificação	27
2.2.3. Fermentação	28
2.3. Integração entre sacarificação e fermentação	29
2.3.1. Sacarificação e fermentação separadas (SHF) e simultâneas (SSF)	30
2.3.2. Sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF)	34
2.3.3. Bioprocessamento consolidado (CBP)	37
2.4. Sacarificação e fermentação de <i>slurries</i> integrais	38
2.5. Inibição e destoxificação	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1. Bagaço de cana-de-açúcar	46
3.1.1. Distribuição granulométrica	47
3.1.2. Implementação da metodologia de análise composicional	47
3.1.3. Análise composicional	48
3.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H ₂ SO ₄ diluído	50
3.2.1. Caracterização química e estrutural dos sólidos pré-tratados	51
3.2.2. Sacarificação enzimática dos sólidos pré-tratados	52
3.2.3. Caracterização química dos hidrolisados hemicelulósicos e das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados	53
3.2.4. Fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos	54
3.2.5. Determinação dos balanços de massa e rendimentos de recuperação de açúcares	56
3.2.6. Avaliação da reprodutibilidade do pré-tratamento na condição de menor severidade	56

3.3. Integração entre sacarificação e fermentação	57
3.3.1. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico (FHH), em separado da sacarificação do sólido pré-tratado e da fermentação do hidrolisado celulósico, separadas (SHF).....	57
3.3.1.1. Destoxificação e fermentação do hidrolisado hemicelulósico.....	57
3.3.1.2. Condicionamento e hidrólise enzimática do sólido pré-tratado, lavado (SL) e não lavado (SNL).....	58
3.3.1.3. Fermentação do hidrolisado celulósico.....	58
3.3.1.4. Eficiência de produção de etanol: FHH + SHF	58
3.3.2. Efeitos da temperatura e do pH.....	59
3.3.3. Sacarificação do sólido pré-tratado, em separado da co-fermentação dos hidrolisados celulósico e hemicelulósico, integradas (ISHCF).....	59
3.3.3.1. Eficiência de produção de etanol: ISHCF	60
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. Bagaço de cana-de-açúcar.....	62
4.1.1. Implementação da metodologia de análise composicional	62
4.1.2. Moagem, fracionamento e caracterização do bagaço “A”	63
4.1.3. Moagem e caracterização do bagaço “B”	69
4.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H ₂ SO ₄ diluído	71
4.2.1. Caracterização química e estrutural dos sólidos pré-tratados	71
4.2.2. Sacarificação enzimática dos sólidos pré-tratados	76
4.2.3. Composição dos hidrolisados hemicelulósicos e das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados.....	79
4.2.4. Fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos	81
4.2.5. Determinação dos balanços de massa e rendimentos de recuperação de açúcares	82
4.2.6. Avaliação da reprodutibilidade do pré-tratamento na condição de menor severidade... ..	84
4.2.6.1. Composição dos sólidos pré-tratados.....	84
4.2.6.2. Composição dos hidrolisados hemicelulósicos e das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados.....	85
4.2.6.3. Determinação dos balanços de massa e rendimentos de recuperação de açúcares .	86
4.3. Integração entre sacarificação e fermentação	87
4.3.1. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico (FHH), em separado da sacarificação do sólido pré-tratado e da fermentação do hidrolisado celulósico, separadas (SHF).....	87

4.3.1.1. Destoxificação e fermentação do hidrolisado hemicelulósico	87
4.3.1.2. Condicionamento e hidrólise enzimática do sólido pré-tratado, lavado (SL) e não lavado (SNL).....	91
4.3.1.3. Fermentação do hidrolisado celulósico	93
4.3.1.4. Eficiência de produção de etanol: FHH + SHF.....	95
4.3.2. Efeitos da temperatura e do pH	97
4.3.3. Sacarificação do sólido pré-tratado, em separado da co-fermentação dos hidrolisados celulósico e hemicelulósico, integradas (ISHCF)	98
4.3.3.1. Eficiência de produção de etanol: ISHCF.....	100
 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	 102
 REFERÊNCIAS	 105
 APÊNDICES	 117

1. INTRODUÇÃO

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto fibroso de natureza lignocelulósica proveniente da extração do suco rico em sacarose da cana-de-açúcar, e é formado por três constituintes estruturais que estão intimamente associados: celulose, hemicelulose e lignina.

Quanto a sua estrutura, o bagaço de cana apresenta heterogeneidade granulométrica e morfológica, sendo constituído principalmente de fibras, vasos e parênquima. O fracionamento e/ou moagem do bagaço previamente ao seu uso em processos de conversão, são estratégias comuns empregadas na redução da heterogeneidade quanto ao tamanho de suas partículas. Ademais, a diferença na composição química das diferentes frações granulométricas pode influenciar a conversão, e a separação das frações granulométricas de interesse pode ser necessária.

A produção de etanol de segunda geração a partir de materiais lignocelulósicos envolve três etapas principais, pré-tratamento, hidrólise enzimática do sólido pré-tratado e fermentação de hexoses e pentoses, que podem ser conduzidos em diferentes configurações. A otimização individual de tais etapas é essencial, mas é importante também que esta otimização seja avaliada de forma integrada. Para a conversão de materiais lignocelulósicos pré-tratados com ácidos diluídos, a estratégia mais comum, descrita na literatura, consiste em submeter o *slurry* (mistura de sólido pré-tratado e hidrolisado hemicelulósico, obtida após o pré-tratamento) a uma etapa de filtração, separando a fração líquida da sólida. Em seguida, a fração sólida é lavada exaustivamente com água e submetida à sacarificação enzimática e à fermentação das hexoses por *Saccharomyces cerevisiae*, que podem ser conduzidas separada (*SHF- Separate Hydrolysis and Fermentation*) ou simultaneamente (*SSF- Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Paralelamente, o hidrolisado hemicelulósico, característico por apresentar concentrações majoritárias de pentoses, no caso de gramíneas, é submetido à fermentação empregando microrganismos apropriados capazes de fermentar pentoses a etanol, como *Scheffersomyces stipitis*, aumentando o rendimento de conversão. A configuração denominada sacarificação e co-fermentação simultânea de pentoses e hexoses, separadas (*SHCF- Separate Hydrolysis and Co-fermentation*), por sua vez, constitui-se em uma estratégia prática e simplificada para a conversão. A integração e simplificação podem ser maximizadas se o *slurry* completo for usado durante todo o processo de conversão. Além

de minimizar custos de separação e lavagem, o uso de *slurries* completos no processo de conversão aumenta a disponibilidade de açúcares, o que pode resultar em aumento da eficiência de conversão. Entretanto, a presença de compostos inibidores que comprometem tanto a sacarificação enzimática do sólido pré-tratado quanto a fermentação microbiana dos açúcares solúveis (fração líquida) pode demandar destoxificação, para amenizar (idealmente, eliminar) o efeito negativo de tais inibidores nas operações supramencionadas.

Face ao exposto, no presente estudo, avaliou-se a conversão dos açúcares do bagaço de cana em etanol, com foco na integração entre o pré-tratamento com H_2SO_4 diluído, a sacarificação com celulasas comerciais e a fermentação com *Scheffersomyces stipitis* DSM-3651, buscando-se uma configuração simplificada. Especificamente, propôs-se:

- Avaliar a moagem e/ou o fracionamento do bagaço de cana como estratégias de condicionamento prévio ao pré-tratamento;
- Definir condições adequadas de pré-tratamento do bagaço de cana com H_2SO_4 diluído;
- Avaliar a conversão dos açúcares contidos no hidrolisado hemicelulósico (destoxificado ou não), em separado da conversão dos açúcares contidos no sólido pré-tratado (lavado ou não);
- Avaliar a conversão dos açúcares contidos no *slurry* (neutralizado, pré-suplementado ou destoxificado com lacase – em configuração híbrida ou não), previamente a hidrólise enzimática, por sacarificação e co-fermentação separadas, integradas (ISHCF).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bagaço de cana-de-açúcar e materiais lignocelulósicos

O bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico, proveniente do processamento da cana-de-açúcar em usinas sucroalcooleiras. Este material é obtido como subproduto na etapa de moagem da cana e queimado nas próprias usinas para a geração de energia elétrica, suprimindo a demanda energética da usina e podendo ainda ser comercializada (SEABRA et al., 2010).

Estima-se que, para cada tonelada de cana processada, sejam gerados 125 Kg de bagaço seco (NOGUEIRA, 2008). Devido à grande quantidade gerada deste material, diferentes aplicações têm sido propostas, entre elas: matéria-prima para produção de ração animal, de polpas celulósicas, ou ainda, de produtos como etanol e xilitol (PANDEY et al., 2000).

A celulose é o principal componente da parede das células encontradas no bagaço de cana, podendo perfazer de 35 a 50% do material. Este é um polissacarídeo formado por unidades de D-glicose que se ligam dando origem a cadeias lineares que tendem a se associar através de pontes de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares. As interações intramoleculares são responsáveis pela manutenção espacial das cadeias unitárias e, junto com as interações intermoleculares, promovem a formação da fibrila elementar durante o processo de biossíntese (Figura 1). Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornam a celulose insolúvel em um grande número de solventes, e explicam, pelo menos em parte, a sua resistência à degradação microbiana (D'ALMEIDA, 1988; RAMOS, 2003).

Figura 1 - Cadeia linear de celulose indicando a sua unidade conformacional, celobiose (A). Associação das cadeias de celulose formando a fibrila elementar (B)

Fonte: RAMOS, 2003

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo cuja composição da cadeia principal varia entre hexoses (D-manose, D-glicose e D-galactose) e pentoses (D-xilose e L-arabinose). Podem-se encontrar pequenas quantidades de desoxihexoses (L-ramnose e L-fucose) e ácidos urônicos (ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico e ácido 4-O-metilglucurônico), ainda podendo ser acetilada ou não. A proporção dos constituintes varia de acordo com a origem do vegetal e tipo de tecido, além de estágio e condições de crescimento (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009). Propriedades como baixo grau de polimerização e estrutura amorfa conferem à hemicelulose menor estabilidade química e térmica, em relação à celulose (EK; GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2009).

Hemiceluloses de gramíneas, como o bagaço de cana-de-açúcar, são geralmente compostas por uma cadeia principal de xilana com grupos pendentes de ácido 4-O-metilglucurônico, ácido acético e arabinose, sendo denominadas glucuronoarabinoxilanas (Figura 2) (GIRIO et al., 2010; RAMOS, 2003).

Figura 2 - Estrutura de hemicelulose de gramínea (glucuronoarabinoxilana)

Fonte: EK et al. 2009

A lignina perfaz a fração não-polissacarídica da parede celular, gerando um composto resistente a ataques microbianos (FENGEL; WEGENER, 1989). A estrutura desta macromolécula provém da polimerização radicalar, iniciada por enzimas, de três precursores primários: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool para-cumarílico (Figura 3). Essa polimerização gera macromoléculas complexas com diferentes tipos de ligações em todas as direções; os tipos mais comuns são β -O-4 e α -O-4 (50-65%), β -1 (9-15%), β -5 (6-15%), 5-5 (2-9%) e β - β (2-5%) (FENGEL; WEGENER, 1989).

Assim como para a hemicelulose, a composição e estrutura da lignina variam conforme a origem do vegetal e tipo de tecido. A lignina derivada de gramíneas, por exemplo, contém quantidades significativas de resíduos derivados dos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico (CARVALHO et al., 2009).

Figura 3 - Estruturas dos álcoois precursores da lignina

Fonte: FENGEL; WEGENER, 1989.

Além dos componentes principais apresentados nos parágrafos anteriores, materiais lignocelulósicos de uma maneira geral apresentam quantidades variáveis de outras substâncias, sumariamente citadas como constituintes minoritários (BROWNING, 1967; LEWIN; GOLDSTEIN, 1991). Tais constituintes incluem compostos orgânicos e inorgânicos, e são divididos em duas classes: a primeira engloba materiais conhecidos como extrativos, por serem extraíveis com água ou solventes orgânicos neutros, ou ainda volatilizados em presença de vapor. A segunda classe engloba materiais que não são extraíveis, como, por exemplo, alguns compostos inorgânicos e proteínas (D'ALMEIDA, 1988). A composição quali-quantitativa destes constituintes nos materiais lignocelulósicos depende de diversos fatores, tais como origem, condições de crescimento e idade da planta (KAI, 1991; D'ALMEIDA, 1988).

Quanto a aspectos estruturais, o bagaço de cana-de-açúcar apresenta grande heterogeneidade morfológica, sendo constituído de fibras (função estrutural), vasos (elementos de condução) e parênquima (função de armazenamento), prioritariamente (SANJUAN et al., 2001).

2.1.1. Granulometria e condicionamento

O bagaço de cana-de-açúcar é um material polidisperso e possui distribuição granulométrica heterogênea com partículas de tamanhos variáveis (DRIEMEIER et al., 2011). Por este motivo, o fracionamento e/ou a redução do tamanho de suas partículas antes de submetê-las a tratamentos químicos é uma estratégia comum descrita na literatura. Isto porque a redução do tamanho de partículas contribui para o aumento de sua área superficial (DRIEMEIER et al., 2011). Além disso, a difusão de reagentes químicos, como o H_2SO_4 , é mais rápida em partículas com menor tamanho, como demonstrado por Kim et al. (2002).

Embora a heterogeneidade no tamanho de partículas do bagaço de cana seja frequentemente reduzida antes do pré-tratamento, os métodos de redução de tamanho e fracionamento, bem como o tamanho das partículas submetidas aos diferentes pré-tratamentos, são bastante variáveis. Enquanto a diminuição do tamanho de partículas empregando o método de moagem é a estratégia mais comum descrita na literatura (CANILHA et al., 2011; GAMEZ et al., 2006; HERNANDEZ-SALAS et al., 2009), a diminuição da heterogeneidade granulométrica desta biomassa lignocelulósica pode ser conduzida empregando apenas a separação em peneiras, removendo as frações de interesse (PIETROBON et al., 2011).

2.1.2. Composição química e estrutura

As composições químicas das diferentes frações do bagaço-de-cana (fibras e finos) são diferentes. A fração de finos geralmente possui altos teores de cinzas e compostos

solúveis em água e etanol (SANJUAN et al., 2001), e baixos teores de lignina (SIQUEIRA et al., 2011), em relação à fração de fibras.

As diferenças na composição química de fibras e finos podem influenciar o processamento da biomassa lignocelulósica a etanol. Por exemplo: teores elevados de cinzas podem afetar o pré-tratamento com H_2SO_4 diluído, pois podem desempenhar ação tamponante (LINDE et al., 2006). Extrativos solúveis em água, constituídos por açúcares extra-fibra, além de outros componentes, também podem influenciar o processamento em meio ácido, uma vez que são facilmente degradados sob determinadas condições de hidrólise ácida, dando origem a compostos inibitórios que comprometem a etapa de fermentação, como HMF (hidroxi-metil-furfural), ácido fórmico e ácido levulínico (BOWER et al., 2008). Os diferentes teores de lignina nas diferentes frações de bagaço de cana (finos e fibras) também influenciam a conversão em açúcares fermentescíveis; frações com baixos teores de lignina são mais reativas à hidrólise enzimática, em relação a frações com teores mais elevados de lignina (SIQUEIRA et al., 2011).

Além de diferenças na composição química, as frações de bagaço também apresentam diferenças estruturais. Maziero et al. (2013), por exemplo, relataram que a porosidade na fração de finos, obtida por tamisação do material *in natura*, foi significativamente maior que aquela observada na fração de fibras.

2.2. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos

Do ponto de vista biotecnológico, os açúcares que perfazem as frações de celulose e hemicelulose dos materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana podem ser utilizados como substratos para a produção de etanol, permitindo às usinas sucro-alcooleiras produzir mais etanol sem aumentar a demanda por mais cana-de-açúcar (CERQUEIRA-LEITE et al., 2009).

Entretanto, o processamento por rota bioquímica ainda possui limitações em três etapas, que podem apresentar diferentes configurações: pré-tratamento da matéria-prima, sacarificação enzimática do material pré-tratado, e fermentação das hexoses e pentoses a etanol (WYMAN, 1994).

2.2.1. Pré-tratamento

A primeira etapa de conversão dos açúcares dos componentes da parede celular dos materiais lignocelulósicos em etanol é denominada pré-tratamento. Independente da estratégia de pré-tratamento a ser empregada no processo, esta etapa tem a finalidade de reduzir a estabilidade do composto natural, sendo utilizada com o intuito de reduzir a interação entre celulose, hemicelulose e lignina, solubilizando a hemicelulose e/ou a lignina, e tornando o material mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

A literatura disponibiliza uma série de revisões que apresentam as diferentes estratégias de pré-tratamento e os efeitos que elas provocam na biomassa lignocelulósica, além das respectivas vantagens e desvantagens (SUN; CHEN, 2002; ALVIRA et al., 2010; GALBE; ZACCHI, 2012).

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com ácidos diluídos, principalmente sulfúrico, tem como principal efeito a remoção da hemicelulose, possuindo mínima influência na extração da lignina (SILVERSTEIN et al., 2007). O principal efeito do pré-tratamento catalisado com ácidos na lignina é a sua modificação estrutural e redistribuição na superfície do sólido pré-tratado (DONOHOE et al., 2008).

Além do sólido pré-tratado, composto basicamente por celulose e lignina, o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com H_2SO_4 diluído gera uma fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) contendo os constituintes da hemicelulose originalmente presente na biomassa. Para gramíneas, como o bagaço de cana, o hidrolisado hemicelulósico é constituído majoritariamente por xilose (CARVALHO et al., 2004). A recuperação da xilose contida nesta fração é importante, uma vez que esta pentose tem grande potencial para aplicação em processos fermentativos visando à produção de diferentes compostos de interesse comercial, como etanol e xilitol (CARVALHO et al., 2005; CANILHA et al., 2010). A eficiência de hidrólise enzimática do sólido pré-tratado gerado após o pré-tratamento é um fator igualmente importante (CANILHA et al., 2011).

Embora elevados rendimentos de açúcares fermentescíveis a partir de celulose (glicose) e hemicelulose (xilose) sejam essenciais para a produção comercial de etanol, trabalhos anteriores utilizando forragem de milho (LLOYD; WYMAN, 2005), *switchgrass* (SHI et al., 2011) e aparas de oliveira (CARA et al., 2008) mostraram que as condições de pré-tratamento que maximizam a recuperação dos açúcares provenientes da hemicelulose

no hidrolisado hemicelulósico e da glicose no hidrolisado celulósico são diferentes. Hsu et al. (2010), por exemplo, avaliando condições operacionais de pré-tratamento da palha de arroz com H_2SO_4 diluído, relataram que, quando o pré-tratamento foi realizado na condição mais severa (190 °C, 8 mg H_2SO_4 / g matéria seca, 4 min), foi observada máxima remoção de hemicelulose e, como consequência, houve um aumento na eficiência de sacarificação enzimática da celulose contida no sólido pré-tratado, atingindo 85% em 72 h. No entanto, a máxima recuperação de xilose no hidrolisado hemicelulósico foi alcançada conduzindo o pré-tratamento em condição mais branda de severidade (180°C, 10 mg H_2SO_4 / g matéria-seca, 1 min).

A fim de evitar a perda de açúcares da hemicelulose durante o pré-tratamento com H_2SO_4 diluído em condições mais severas, a condução do pré-tratamento em duas etapas pode ser empregada. Esta abordagem consiste, inicialmente, em uma pré-hidrólise da biomassa em condições brandas de severidade, maximizando a recuperação da xilose no hidrolisado hemicelulósico, seguida por um tratamento mais severo, destinado a gerar um sólido mais reativo à hidrólise enzimática (NGUYEN et al. 2000; SÖDERSTROM et al., 2004).

2.2.2.Sacarificação

A sacarificação dos açúcares contidos na fração sólida pré-tratada pode ser conduzida empregando ácidos ou enzimas. Apesar do baixo custo, o uso de ácidos tem a desvantagem de levar à degradação de açúcares, gerando compostos que inibem a conversão subsequente (HARRIS et al. 1985). O emprego de enzimas, por outro lado, é conduzido sob condições brandas de operação (pH e temperatura), além de não gerar correntes ácidas que precisam ser neutralizadas para a fermentação (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

A hidrólise enzimática da celulose é realizada através da ação de três classes de enzimas, endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, que atuam em sinergismo, aliviando o problema de inibição por produtos. As endoglucanases atuam internamente na molécula de celulose, diminuindo o seu grau de polimerização. As exoglucanases atuam nas regiões terminais da molécula de celulose, promovendo a retirada de dímeros terminais

de celobiose. E, finalmente, as β -glicosidasas hidrolisam a celobiose à glicose (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Dependendo das condições de pré-tratamento, uma parte da hemicelulose pode remanescer no sólido pré-tratado, e a eficiência de sacarificação da biomassa pode ser aumentada com o emprego de hemicelulases (ÖHGREN et al., 2007). O sistema hemicelulolítico requerido para a hidrólise da hemicelulose é mais complexo que o sistema celulolítico, já que a hemicelulose apresenta natureza heterogênea. Inclui, entre outras enzimas: 1) endo-1,4- β -D-xilanases (EC 3.2.1.8), que hidrolisam ligações glicosídicas internas na cadeia principal de xilana, 2) 1,4- β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37), que hidrolisam xilooligossacarídeos, liberando xilose, e 3) enzimas acessórias envolvidas na remoção de grupos substituintes laterais como α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), α -glucuronidasas (EC 3.2.1.139) e acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72) (JORGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

2.2.3.Fermentação

Os açúcares obtidos após o pré-tratamento do material lignocelulósico com ácidos diluídos e/ou na sacarificação dos sólidos pré-tratados com enzimas devem ser quantitativamente convertidos em etanol (KUHAD et al., 2011); para a economia do processo e para a sustentabilidade ambiental.

Apesar de *Saccharomyces cerevisiae*, empregada para a produção de etanol em meios à base de hexoses, poder ser geneticamente modificada para produzir etanol a partir de pentoses, tais como xilose e arabinose (BETTIGA et al., 2009), há também uma variedade de leveduras selvagens capazes de produzir etanol a partir de tais substratos; entre elas *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* e *Scheffersomyces* (antiga *Pichia*) *stipitis* (JEFFRIES; KURTZMAN, 1994).

Dentre as leveduras que produzem etanol naturalmente a partir de pentoses, *S. stipitis* se destaca devido à sua elevada eficiência de conversão de substrato em produto e versatilidade no consumo de diferentes açúcares, ainda que apresente exigências rigorosas de oxigênio para a rápida produção de etanol a partir de pentoses e seja suscetível à diversos compostos inibidores (AGBOGBO; COWARD- KELLY, 2008); a depender, também, da composição do meio e das condições de cultivo.

2.3.Integração entre sacarificação e fermentação

A conversão dos açúcares contidos na biomassa lignocelulósica em etanol pode ser realizada empregando diferentes configurações de processo, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Configurações de processo para a conversão de biomassas lignocelulósicas em etanol.

Fonte: Arquivo pessoal

Tradicionalmente, o *slurry* obtido após o pré-tratamento (mistura de sólido pré-tratado e hidrolisado hemicelulósico) é separado em frações sólida e líquida. Em seguida, a fração sólida é submetida à sacarificação enzimática e fermentação, operações que podem ser conduzidas separadas (SHF - do inglês *Separate Hydrolysis and Fermentation*) ou

simultaneamente (SSF - do inglês *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) (ALFANI et al., 2000; SAHA et al., 2005; SÖDERSTROM; GALBE; ZACCHI, 2007). O hidrolisado hemicelulósico, por sua vez, também é fermentado a etanol, contribuindo para o aumento do rendimento em produto (GUPTA et al., 2009).

A sacarificação da fração sólida pode ser conduzida tanto com sólidos “lavados” quanto com sólidos “não lavados”. A “lavagem”, ou extração dos sólidos pré-tratados, feita com água em abundância, é uma estratégia que visa à remoção de inibidores solúveis ainda presentes na fração sólida (após o procedimento de separação sólido-líquido), mas que compromete a recuperação de açúcares, ao gerar uma corrente líquida altamente diluída (SÖDERSTRÖM et al., 2004).

Ao invés da separação sólido-líquido, o uso do *slurry* integral obtido após o pré-tratamento tem sido proposto para a conversão dos açúcares em etanol, seja por SHF ou SSF. A não separação sólido-líquido após o pré-tratamento é atrativa, uma vez que, além de agregar simplicidade ao processo, não implica em “perda” de açúcares; entretanto, a presença de inibidores pode comprometer tanto a sacarificação dos sólidos quanto a fermentação dos açúcares (MORENO et al., 2013).

2.3.1. Sacarificação e fermentação separadas (SHF) e simultâneas (SSF)

No processamento via SHF (Tabela 1), a hidrólise enzimática do sólido pré-tratado e a fermentação do hidrolisado celulósico são conduzidas em vasos reacionais diferentes, em suas respectivas condições ótimas de temperatura e pH. A temperatura utilizada em ensaios de sacarificação enzimática do sólido pré-tratado fica em torno de 45-50 °C; já os ensaios de fermentação são conduzidos em temperaturas entre 30 e 35 °C, dependendo do microrganismo e das demais condições operacionais. A levedura *S. cerevisiae* é bastante utilizada nesta configuração, uma vez que o hidrolisado celulósico contém majoritariamente glicose. A principal limitação da estratégia de SHF é a inibição das enzimas envolvidas na sacarificação enzimática por seus próprios produtos de hidrólise; especialmente em meios reacionais com altos teores de sólidos (HODGE et al., 2008; ANDRIC et al., 2010).

Por outro lado, a condução simultânea da hidrólise enzimática do sólido pré-tratado e da fermentação do hidrolisado celulósico (SSF) (Tabela 2), além de ser uma concepção

mais simplificada de processo, possui a vantagem de, uma vez que a sacarificação e a fermentação ocorrem juntas no mesmo vaso reacional, os açúcares liberados durante a sacarificação são prontamente consumidos pelo microrganismo durante a fermentação, aliviando o efeito inibitório da glicose e da celobiose sobre as celulasas (EKLUND; ZACCHI, 1995). Entretanto, as condições de temperatura e pH ótimos para a hidrólise enzimática e para a fermentação são diferentes; e a conversão de açúcares em etanol pode ser prejudicada ao se ajustar a temperatura e o pH em valores mais apropriados para o microrganismo, comprometendo a eficiência e/ou prolongando o tempo de conversão (ZHAO et al., 2012).

O emprego de microrganismos termotolerantes, como *Kluyveromyces marxianus* (BALLESTEROS et al., 1991), é uma estratégia para contornar o inconveniente supramencionado. A execução da pré-hidrólise enzimática do material por um determinado tempo, previamente à adição do microrganismo e ajuste das condições adequadas para o seu metabolismo, em uma configuração denominada sacarificação e fermentação híbridas (HSF - do inglês *Hybrid Saccharification and Fermentation*), também é uma estratégia para diminuir o efeito negativo na sacarificação enzimática, durante o período em que é conduzida em temperaturas mais baixas e pHs mais altos que os valores ótimos (ZHANG et al., 2010; MESA et al., 2011).

Tabela 1 - Variáveis e parâmetros da conversão de materiais lignocelulósicos via SHF

Referência	Substrato	Sólidos insolúveis (% m/m)	Enzimas	Carga de enzima	Temperatura (°C)	pH	Tempo (h)	Rendimento (%)	Produtividade (g/L.h)
Gupta et al. (2009)	A	5	Celulase (<i>T. reesei</i>) + Novozym 188	3 U + 9 U / mL tampão	50	5,0	36	82,8	n.r.
Ohgren et al. (2007)	B	8	Novozymes (NS50010 + NS50013)	10 FPU/g substrato	45	5,0	120	65,9	0,95
	C							78,5	1,46
Saha et al. (2005)	D	n.r.	Celluclast + Novozym 188+ Viscostar 150 L+ Pectinase solids	0,01-0,02 mL/g substrato	45	5,0	72	74,0	n.r.
Chandel et al. (2013)	E	5	Celluclast + Novozym 188	15 FPU + 17,5 U / g substrato	50	4,8	96	n.r.	n.r.
Peng et al. (2011)	F	4	Novozymes (342)	18 FPU/ g substrato	50	4,5	82	82,1	n.r.
Referência	Microrganismo	Células	Temperatura (°C)	pH	Tempo (h)	Y _{p/s} (g/g)	Etanol (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Eficiência de conversão (%)
Gupta et al. (2009)	<i>S. cerevisiae</i>	10% v/v	30°C	5,5	16	0,49	18,5	1,16	n.r.
Ohgren et al.(2007)	<i>S. cerevisiae</i> (Tembec I)	-	-	-	-	0.39***	16,3***	-	59,3*
						0.32***	19,4***	-	70,6*
Saha et al. (2005)	<i>E. coli FBR5</i>	10% v/v	35°C	6,5	118	0.24	19,0	n.r.	n.r.
Chandel et al. (2013)	<i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124	1 g/L	30°C	n.r.	16	0.30	3,8	0.24	n.r.
Peng et al. (2011)	<i>S. cerevisiae</i> GIM-2	6% v/v	33°C	n.r.	16	0,34	9,5	0,59	53,0**

A - *Prosopis juliflora* pré-tratada (H₂SO₄ diluído + Na₂SO₃ + NaClO₂) e lavada; B- Forragem de milho pré-tratada (SO₂); C- Forragem de milho pré-tratada (SO₂) e lavada; D - Palha de trigo pré-tratada (H₂SO₄); E - Bagaço de cana pré-tratado (NH₃); F - *Paper sludge*. n.r. = Não relatado. * - Com base na produção teórica de etanol a partir da massa de glicose potencial presente no material *in natura*; ** - Com base na produção teórica de etanol a partir da massa de carboidratos potenciais presentes no material *in natura*; *** - Com base em conversão teórica, assumindo fator de conversão de substrato em produto igual a 0,46 g/g.

Tabela 2 - Variáveis e parâmetros da conversão de materiais lignocelulósicos via SSF

Referência	Substrato	Sólidos insolúveis (% m/m)	Enzima	Carga de enzima	Microrganismo
Ohgren et al. (2007)	A	8	Novozymes (NS50010 - NS50013)	10 FPU/g substrato	<i>S. cerevisiae</i> (Tembec I)
	B				
Saha et al. (2005)	C	n.r.	Celluclast + Novozym 188 + Viscostar 150 L	2 mL/100g de substrato	<i>E coli</i> (FRB5)
Chandel et al. (2013)	D	5	Celluclast + Novozym 188	15 FPU/g substrato	<i>S. stipitis</i> (NRRL Y-7124)
Ballesteros et al. (2004)	E	10	Celluclast	15 FPU/g substrato	<i>K. marxianus</i> (CECT 10875)
	F				
	G				
	H				
	I				
Santos et al. (2012)	J	8	Celluclast + Novozym 188	10 FPU/g substrato	<i>S. cerevisiae</i> (UFPEDA 1238)

Referência	Células	Temperatura (°C)	pH	Tempo (h)	Y _{P/S} (g/g)	Etanol (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Eficiência de conversão* (%)
Ohgren et al. (2007)	1 g/L	35	5,0	120	0,35	18,2	0,15	64,1
					0,40	20,5	0,17	72,4
Saha et al. (2005)	10% (v/v)	35	6,0	136	0,17	13,2	0,10	n.r
Chandel et al. (2013)	1 g/L	50/30	5,0	24/96	0,38	10,3	0,21	n.r
Ballesteros et al. (2004)	4% (v/v)	42	n.r	160	0,36	19,0	0,12	71,2
					0,32	17,0	0,11	62,5
					0,32	18,1	0,11	62,5
					0,31	16,2	0,10	60,9
					0,35	19,0	0,12	68,1
Santos et al. (2012)	1 g/L	50/37	n.r	6/24	n.r.	27,7	0,77	n.r

A = Forragem de milho pré-tratada (SO₂); B = Forragem de milho pré-tratada (SO₂) e lavada; C = Palha de trigo pré-tratada (H₂SO₄); D = Bagaço de cana pré-tratado (NH₃); E = Poplar pré-tratado (explosão a vapor); F = Eucalipto pré-tratado (explosão a vapor); G = Palha de trigo pré-tratada (explosão a vapor); H = Bagaço de sorgo pré-tratado (explosão a vapor); I = Brassica carinata pré-tratado (explosão a vapor) J = Bagaço de cana pré-tratado (explosão a vapor/NaOH). n.r. = Não relatado. *Com base na produção teórica de etanol a partir da massa de glicose potencial presente no material *in natura*.

As compilações dos níveis de variáveis dependentes e independentes envolvidas nas configurações SHF e SSF, apresentadas nas Tabelas 1 e 2, ilustram a diversidade de dados disponíveis na literatura. De maneira geral, parece existir um consenso quanto às diferenças de temperatura e pH ótimos para a hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados e para a fermentação dos hidrolisados celulósicos; e, neste contexto, a vantagem do processo SHF é possibilitar a condução destas duas etapas de conversão em condições otimizadas. Por outro lado, as muitas variações na natureza do material submetido à conversão, e também na natureza dos biocatalisadores utilizados, dificultam o estabelecimento de comparações entre as diferentes configurações, em termos de eficiência de processo.

2.3.2. Sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF)

A configuração denominada sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF - do inglês *Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*) consiste em uma variação da configuração SSF. Além da hidrólise enzimática e fermentação do hidrolisado celulósico serem conduzidas simultaneamente, o hidrolisado hemicelulósico é incorporado ao meio reacional. Nesta configuração, os açúcares provenientes dos hidrolisados celulósico (hexoses) e hemicelulósico (pentoses) são co-fermentados, empregando culturas puras ou mistas (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996). No caso do emprego de culturas puras, idealmente, são utilizados microrganismos capazes de fermentar tanto hexoses quanto pentoses (RUDOLF et al., 2007). Apesar do alto nível de integração de processo, a eficiência da conversão dos açúcares em etanol pode ser comprometida por compostos inibitórios presentes no hidrolisado hemicelulósico, que podem afetar tanto a hidrólise enzimática (TENGBORG et al., 2001) quanto a fermentação (RUDOLF et al., 2007). Sem considerar que a conversão também pode ser prejudicada devido às diferenças de temperatura e pH adequados para a sacarificação e para a fermentação, como já discutido.

A Tabela 3 compila variáveis dependentes e independentes associadas à conversão dos açúcares contidos em diferentes materiais lignocelulósicos em etanol, via SSCF. A conversão dos açúcares do bagaço de cana em etanol via SSCF com uma linhagem de *S. cerevisiae*

isolada da fermentação de "*spent sulphite liquor*" e engenheirada para utilização de xilose, por exemplo, foi melhor que aquela obtida com uma linhagem selvagem de *S. stipitis* (RUDOLF et al., 2007); o que, de certa forma, indica a necessidade de destoxificação previamente à fermentação.

Tabela 3 - Variáveis e parâmetros da conversão de materiais lignocelulósicos via SSCF

Referência	Substrato	Sólidos insolúveis (% m/m)	Enzima	Carga de enzima	Microrganismo			
Rudolf et al.(2007)	A	5	Celluclast + Novozym 188	12 FPU + 12 U/g substrato	<i>S. cerevisiae</i> TMB 3400			
					<i>S. stipitis</i> CBS 6054			
Olofsson et al. (2008)	B	7	Xylanase XL + Novozym 188	21 FPU + 25 U/g glucana	<i>S. cerevisiae</i> TMB 3400			
Carrasco et al. (2011)	C	7	Celluclast + Novozym 188	15 FPU + 14 U/g substrato	<i>S. cerevisiae</i> TMB 3400			
Carrasco et al. (2013)	D	10	Celluclast + Novozym 188	15 FPU + 14 U/g substrato	<i>S. stipitis</i>			

Referência	Células (g/L)	Temperatura (°C)	pH	Tempo (h)	Y _{P/S} (g/g)	Etanol (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Eficiência de conversão*
Rudolf et al.(2007)	4	32	5,0	100	0,35	20,7	0,21	n.r
		35	6,0		0,28	17,1	0,17	n,r
Olofsson et al. (2008)	4	34	5,5	96	0,38	32,9	0,34	75
Carrasco et al. (2011)	5	32	5,0	96	0,43	26,8	0,71	85
Carrasco et al. (2013)	5	35	6,0	96	0,24	19,1	0,35	47

A = Bagaço de cana pré-tratado com SO₂; B = Palha de trigo pré-tratada com H₂SO₄ diluído; C = Paja brava pré-tratada com SO₂; D = Paja brava pré-tratada com SO₂. n.r.= Não relatado. *Com base na produção teórica de etanol a partir da massa de glicose e xilose presente na fração líquida e sólido pré-tratado.

Uma alternativa à configuração SSCF, denominada sacarificação e co-fermentação separadas (SHCF - do inglês *Separate Hydrolysis and Co-Fermentation*), consiste na hidrólise enzimática do sólido pré-tratado, previamente e separado do hidrolisado hemicelulósico, em condições ótimas para a ação das enzimas, seguida pela co-fermentação dos açúcares contidos nos hidrolisados celulósico e hemicelulósico, também em condições ótimas para a ação dos microrganismos (ZHAO et al., 2012). Outra estratégia aplicada para contornar os efeitos negativos provocados pelas condições adversas de temperatura e pH, e também pelos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico, consiste em conduzir a fermentação do hidrolisado hemicelulósico previamente à hidrólise enzimática do sólido pré-tratado, que, por sua vez, precede a bioconversão da glicose, proveniente da celulose, em etanol, também por fermentação. Tengborg et al. (2001), por exemplo, avaliando a hidrólise enzimática de abeto pré-tratado com SO₂ em presença de hidrolisado hemicelulósico, reportaram que os compostos presentes nesta fração prejudicaram a sacarificação do sólido pré-tratado, e que a fermentação do hidrolisado hemicelulósico, previamente à hidrólise enzimática do sólido pré-tratado, aumentou o rendimento de sacarificação, para um valor próximo àquele observado durante a hidrólise enzimática do sólido pré-tratado lavado. Os autores também demonstraram que a simples adição de nutrientes ao *slurry*, previamente à sacarificação enzimática, pode minimizar a inibição das enzimas; sem prejudicar a reciclagem das células após a (subsequente) fermentação, na ausência de sólidos insolúveis.

2.3.3. Bioprocessamento consolidado (CBP)

A produção de enzimas e a conversão dos açúcares da biomassa lignocelulósica em etanol, simultaneamente, por um único microrganismo ou por uma comunidade microbiana, é proposta em uma configuração denominada bioprocessamento consolidado (CBP - do inglês *Consolidated Bioprocessing*). Sabe-se que existe uma série de microrganismos que utilizam a celulose como fonte de carbono, produzindo celulasas como parte de seu metabolismo; e outros, que convertem açúcares em etanol. A princípio, a ideia associada à configuração CBP é empregar um microrganismo ou comunidade microbiana que produza as enzimas necessárias

para a sacarificação da celulose e, em seguida, seja capaz de converter os açúcares em etanol; em um processo com elevado rendimento em produto (LYND et al., 2005). Na natureza, ainda não foi identificado um microrganismo ou comunidade microbiana que desempenhe estas atividades simultaneamente, com eficiência para aplicação industrial; mas espera-se que, no futuro, biocatalisadores e sistemas de conversão apropriados sejam desenvolvidos (ZHAO et al., 2012).

2.4. Sacarificação e fermentação de *slurries* integrais

A utilização de *slurries* integrais, sem separação sólido-líquido e sem extração, é uma alternativa para o processo de conversão. Além de proporcionar simplificação de processo, minimizando custos de separação e lavagem, o emprego de *slurries* integrais possui a principal vantagem de propiciar a utilização integral dos açúcares contidos na matéria prima; partindo do pressuposto de que se utiliza microrganismos capazes de fermentar pentoses e hexoses (TOMÁS-PEJÓ et al., 2008).

Apesar das vantagens supramencionadas, os *slurries* provenientes de pré-tratamentos termoquímicos geralmente contêm compostos que prejudicam a conversão, tanto em nível de hidrólise enzimática quanto em nível de fermentação. Consequentemente, a minimização da formação de inibidores durante o pré-tratamento e/ou a remoção de tais compostos por meio do uso de estratégias de destoxificação apropriadas são geralmente utilizadas para aumentar a eficiência de conversão (GALBE; ZACCHI, 2012; OLOFSSON et al. 2008).

Jung et al. (2013), por exemplo, avaliando a conversão de bagaço de dendezeiro pré-tratado com H_2SO_4 diluído em etanol (SSF), relataram que a eficiência de conversão do *slurry* integral (52,5 %) foi superior à eficiência de conversão da fração sólida lavada (47,2 %), devido à maior disponibilidade de açúcares; ademais, os autores mostraram ainda que a destoxificação do *slurry* integral com carvão ativado levou à remoção de inibidores solúveis do meio, aumentando significativamente a eficiência de conversão (87,5%).

Tabela 4 - Variáveis e parâmetros da conversão de *slurries* integrais em etanol

Referência	Substrato	Configuração	Sólidos insolúveis (% m/m)	Enzima	Carga de enzima	Destoxificação	Microrganismo	
Tomas-Pejó et al. (2008)	A	SHF	10	Celluclast + NS50010	15 FPU + 15U/g celulose	-	<i>S. cerevisiae</i> F12	
		SSF						
	B	SHF						
		SSF						
Jung et al. (2013)	C	SSF	6	Celluclast + Novozym 188	30 FPU + 30CBU/g glucana	-	<i>S. cerevisiae</i> D ₅ A	
	D					-		
						Carvão ativado		
Romani et al. (2014)	E	SSF	30	Cellic Ctec ₂ + Htec ₂	22,4 FPU + 500 UI/g substrato	-	<i>S. cerevisiae</i> PE-2	
		HSSF						
Shen et al. (2011)	F	SSF	n.r	NS50052	21 FPU/g glucana	-	<i>S. cerevisiae</i>	
		HSSF						
Referência	Células (concentração)	Temperatura (°C)	pH	Tempo (h)	Y _{P/S} (g/g)	Etanol (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Eficiência de conversão* (%)
Tomas-Pejó et al. (2008)	1 g/L	32	5,0	120	0,41	12,7	n.r	n.r
					0,49	15,2	0,30	n.r
					0,38	22,6	n.r	n.r
					0,43	23,7	0,40	n.r
Jung et al. (2013)	5 % m/v	30	4,8	72	n.r	n.r.	n.r.	47,2
								52,5
								87,5
Romani et al. (2014)	n.r	35	n.r	120	n.r	50,2	0,63	85,3
				24/120	n.r	48,8	0,55	82,9
Shen et al. (2011)	n.r	36	4,8	72	0,19	6,0	0,08	68,2
				24/48	0,21	6,7	0,09	78,5

A = Palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor; B = *Slurry* de palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor; C = Bagaço de dendezeiro pré-tratado com H₂SO₄ diluído e lavado D = *Slurry* de bagaço de dendezeiro pré-tratado com H₂SO₄ diluído; E = *Slurry* de *Eucalyptus globulus* pré-tratado termicamente; F = *Slurry* de cotton gin (75%) e paper sludge (25%) pré-tratados por explosão a vapor. n.r.= Não relatado. *Com base na produção teórica de etanol a partir da massa de glicose presente no material de partida.

Conforme ilustrado na Tabela 4, embora as configurações de processo utilizadas para a conversão de *slurries* integrais em etanol sejam variáveis, inclusive em termos de denominação, o uso de *slurries*, associado ao emprego de estratégias de destoxificação, aumenta a eficiência de conversão dos açúcares em etanol.

2.5. Inibição e destoxificação

Açúcares à parte (HODGE et al., 2008; QING; WYMAN, 2011), durante o pré-tratamento termoquímico de materiais lignocelulósicos são gerados compostos que podem inibir as etapas de hidrólise enzimática e de fermentação.

Em meio ácido, furanos (furfural e HMF) são formados pela degradação de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose); dependendo da severidade do pré-tratamento, o furfural pode se degradar gerando ácido fórmico, e o HMF, gerando ácidos fórmico e levulínico. Além destes, ácido acético, proveniente da hidrólise dos radicais acetila encontrados na estrutura de algumas hemiceluloses, também é formado. Apesar da baixa solubilidade da lignina em meios ácidos, derivados aromáticos de baixa massa molar também são liberados para o hidrolisado hemicelulósico durante o pré-tratamento (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A presença dos compostos supramencionados em hidrolisados hemicelulósicos pode comprometer a etapa de fermentação (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; LARSSON et al., 1999). O grau de inibição, entretanto, é dependente da natureza e concentração dos inibidores presentes, do microrganismo e das condições de cultivo. Delgenes et al. (1996), por exemplo, avaliando a inibição de *S. stipitis* NRRL Y-7124 por ácido acético, vanilina, furfural, HMF e siringaldeído, em meio sintético a base de xilose, relataram que todos os inibidores avaliados causaram diminuição no crescimento celular e na produção de etanol; a intensidade de inibição foi proporcional à concentração do inibidor, sendo que os fenóis derivados da lignina apresentaram maior toxicidade que os furanos e o ácido acético.

De forma que a utilização de estratégias de destoxificação, previamente à fermentação, é bastante reportada na literatura, sendo os métodos de destoxificação agrupados em três

categorias: físicos (evaporação, por exemplo), químicos (alteração de pH, por exemplo) e biológicos (polimerização com enzimas, por exemplo) (MUSSATO; ROBERTO, 2001). Neste contexto, a Tabela 5 compila parâmetros determinados em alguns estudos visando a destoxificação de hidrolisados para a produção de etanol.

Dentre os diferentes métodos, a estratégia de *overliming* é uma das mais tradicionais. Em geral, o método consiste em elevar o pH do hidrolisado para 10 com Ca(OH)_2 e, posteriormente, ajustá-lo para 7 com H_2SO_4 ; procedimento que pode ser seguido de adsorção em carvão ativado (GUPTA et al., 2009). A ação de destoxificação é atribuída tanto à precipitação de componentes tóxicos, quanto à conversão de alguns compostos para formas menos tóxicas em pHs elevados; e à adsorção de compostos aromáticos, no caso da utilização de carvão ativado. Entre as desvantagens, pode-se citar a geração e a necessidade de separação de precipitados, e a perda de açúcares fermentescíveis (MUSSATO; ROBERTO, 2004). Neste contexto, de acordo com Jennings e Schell (2011), o uso de NH_4OH para elevar o pH do hidrolisado, como alternativa ao uso de Ca(OH)_2 , pode ser vantajoso, uma vez que a degradação de açúcares é pequena, e que o nitrogênio adicionado ao meio pode favorecer a conversão microbiana; a formação de precipitados também é minimizada (ALRIKSSON et al., 2006).

O uso de enzimas oxidativas, como lacases, para a destoxificação de hidrolisados é uma estratégia que confere sustentabilidade ao processo; o reagente é biodegradável, e a destoxificação é conduzida em condições brandas de reação (pH e temperatura). A ação benéfica é decorrente da capacidade das enzimas em oxidar compostos fenólicos derivados de lignina (MUSSATO; ROBERTO, 2004). Chandel et al. (2007), por exemplo, avaliando diferentes métodos para a destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana visando à produção de etanol por *Candida shehatae* NCIM 3501, relataram redução de 77,5% na concentração de compostos fenólicos do hidrolisado tratado com lacase, duplicando a produção de etanol em relação à fermentação do hidrolisado "não destoxificado". As lacases oxidam os grupos fenólicos de derivados da lignina, levando a radicais estabilizados por ressonância, que, por sua vez, podem participar de reações radicalares, levando à formação de ligações covalentes (polimerização). Além do potencial de oxidação das enzimas, o perfil dos produtos de oxidação depende do pH e da temperatura de reação. É importante mencionar também que o tratamento com lacases pode levar à despolimerização de lignina; em geral, na

presença de mediadores apropriados, que aumentam o potencial de oxidação e eliminam o impedimento estérico (ARESKOGH et al., 2010).

A aplicação de ditionito de sódio foi proposta para a destoxificação de hidrolisado celulósico de bagaço de cana, proveniente de pré-tratamento termoquímico e hidrólise enzimática subsequente (ALRIKSSON; CAVKA; JONSSON, 2011); os autores reportaram um aumento de aproximadamente 5 vezes na produção de etanol (SHF) após a destoxificação (10 mM, 10 min, 23 °C). De acordo com Chung et al. (1981), o ditionito de sódio é um agente redutor capaz de promover a redução de diversos grupos funcionais, com poder redutor aumentado em pHs alcalinos; reduz aldeídos e cetonas (compostos carbonilados) por mecanismos que, preferencialmente, envolvem sulfonação. De fato, em experimentos com meios sintéticos a base de glicose, Cavka e colaboradores (2011) sugeriram que o ditionito de sódio sulfona aldeídos aromáticos, reduzindo a sua toxicidade. Pode-se dizer que a destoxificação de hidrolisados com ditionito de sódio confere praticidade ao processo de conversão, uma vez que não demanda ajuste de pH para valores diferentes daqueles comumente utilizados, e pode ser conduzido rapidamente em temperatura ambiente, no *slurry* completo ou nas frações obtidas após o fracionamento, sem degradação de açúcares (ALRIKSSON; CAVKA; JÖNSSON, 2011).

Tabela 5 - Variáveis e parâmetros da destoxificação de hidrolisados para a fermentação alcoólica

Referência	Matéria-prima	Substrato (Concentração)	Destoxificação (Método)	Reagente (Concentração)	Temperatura (°C)	pH		
Alriksson et al.(2011)	A	110,9 g/L	-	-				
			Ditionito de sódio	10 mM	23	5,3		
			Sulfito de sódio	10 mM	23	5,3		
Gupta et al. (2009)	B	18,2 g/L	<i>Overliming</i>	Ca(OH) ₂ + H ₂ SO ₄	n.r.	10,0 / 7,0		
Chandel et al. (2007)	C	20,0 g/L	Resina de troca iônica	Resina aniônica (5:1 v/m)	25	5,5		
			Carvão ativado	1:10 (m/v)	25	n.r		
			Lacase	1 U/mL	30	n.r		
			<i>Overliming</i>	Ca(OH) ₂ + H ₂ SO ₄	n.r.	10,0 / 5,5		
			Neutralização	Ca(OH) ₂	25	5,5		
Referência	Microrganismo	Células (Concentração)	Temperatura (°C)	Ph	Tempo (h)	Y _{P/S} (g/g)	Etanol (g/L)	Produtividade (g/L h)
Alriksson et al. (2011)	<i>S. cerevisiae</i>	2 g/L	n.r.	n.r.	6	0,21	5,0	0,90
						0,34	24,0	3,90
						0,32	19,0	2,90
Gupta et al. (2009)	<i>S. stipitis</i> NCIM 3498	10% v/v	30	5,5	24	0,39	7,1	0,30
Chandel et al. (2007)	<i>Candida shehatae</i> NCIM 3501	n.r.	30	5,5	24	0,48	8,7	0,36
						0,42	7,4	0,31
						0,37	6,5	0,27
						0,30	5,2	0,22
						0,22	3,5	0,14

A = Hidrolisado celulósico de bagaço de cana, obtido após pré-tratamento termoquímico e hidrólise enzimática; B = Hidrolisado hemicelulósico de *Prosopis juliflora*, obtido após pré-tratamento com H₂SO₄ diluído; C = Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, obtido após pré-tratamento com HCl; n.r. = Não relatado.

Compostos solúveis que atuam como inibidores de fermentação, como furanos e ácidos alifáticos, também podem atuar como inibidores de sacarificação enzimática; mas de forma limitada, em comparação à inibição exercida por fenóis (JING et al., 2009; XIMENES et al., 2010) e xilooligossacarídeos (QING; WYMAN, 2011). No que concerne o condicionamento da fração sólida, previamente à sacarificação enzimática, e, também, no que concerne o efeito negativo que os compostos solúveis exercem na hidrólise enzimática, a Tabela 6 compila alguns resultados obtidos durante a avaliação de diferentes estratégias.

Soudham e colaboradores (2011), avaliando o efeito de ditionito de sódio na hidrólise enzimática de madeira de abeto pré-tratada lavada e não lavada, observaram que o emprego de ditionito de sódio (15 mM) na sacarificação de sólidos lavados não acarretou em diferenças significativas em termos de liberação de glicose (31 g/L) em relação a sacarificação conduzida na ausência de ditionito (29 g/L); entretanto, a liberação de glicose a partir dos sólidos não lavados foi maior (24,7 g/L) que aquela determinada no material não condicionado (18,6 g/L). Moilanen et al. (2012), avaliando o efeito de lacase na digestão enzimática de *spruce* e *giant reed* submetidos a pré-tratamento termoquímico catalisado por SO₂, reportaram que a adição de lacase favoreceu o rendimento de hidrólise enzimática de *spruce* em 12%; entretanto, foi observada diminuição do rendimento de hidrólise de *giant reed* em 17%, demonstrando que a eficiência do tratamento é dependente da composição e estrutura do material. Neste contexto, no que concerne a hidrólise enzimática de *slurries* completos, o efeito do condicionamento com lacases está relacionado principalmente à polimerização de compostos fenólicos solubilizados durante o pré-tratamento; idealmente, separando as frações sólida e líquida antes da destoxificação (JURADO et al., 2009).

Por fim, a estratégia de condicionamento mais comumente relatada na literatura consiste na extração da fração sólida, após separação da fração líquida, com água. Entretanto, conforme já mencionado, implica em etapa adicional, com consumo de água e geração de uma corrente diluída de açúcares. Ainda, no caso de pré-tratamentos termoquímicos conduzidos em meios ácidos, uma estratégia frequentemente utilizada para a melhoria da sacarificação enzimática dos açúcares contidos nas frações sólidas consiste na deslignificação. Cantarella et al. (2004), por exemplo, ao submeter o *slurry* proveniente do pré-tratamento de *poplar* a *overliming* (com Ca(OH)₂, a 80 °C por 2 h), obtiveram 49,4 g/L de glicose após a sacarificação; na sacarificação da fração sólida não lavada, 37,6 g/L.

Tabela 6 - Variáveis e parâmetros do condicionamento de sólidos pré-tratados para a hidrólise enzimática

Referência	Matéria-prima	Sólidos insolúveis (%)	Destoxificação (Método)	Reagente (Concentração)	Temperatura (°C)	pH	Tempo	
Soudham et al. (2011)	A	10	Ditionito de sódio	15 mM	25	n.r.	30 min	
			-	-				
	B		Ditionito de sódio	15 mM				
			-	-				
Moilanen et al. (2011)	C	2	Lacase	1000 nkat/g substrato	n.r.	n.r	24h	
			-	-				
	D		Lacase	1000 nkat/g substrato				
			-	-				
Cantarella et al. (2004)	E	10	-	-	80	11	24h	
			<i>Overliming</i>	Ca(OH) ₂				
	F		-	-				
Referência	Enzima		Carga de enzima	Temperatura (°C)	pH	Tempo (h)	Glicose (g/L)	Rendimento* (%)
Soudham et al. (2011)	Celluclast + Novozym 188		23,5 FPU/g substrato	45	n.r	120	31,0	n.r.
							29,0	n.r.
							24,7	n.r.
							18,6	n.r.
Moilanen et al. (2011)	Celluclast + Novozym 188		10 FPU/g substrato	45	5,0	72	n.r	89,6
							n.r	80,0
							n.r	49,8
							n.r	60,0
Cantarella et al. (2004)	Celluclast + Novozym 188		0,06 g/g substrato	45	4,8	66	44,3	80,7
							49,4	88,4
							37,6	72,0

A = Madeira de abeto pré-tratada com SO₂ e lavada; B = Madeira de abeto pré-tratada com SO₂ não lavada; C = Madeira de abeto pré-tratada com SO₂ e lavada; D = *Giant reed* pré-tratada termicamente (sem catalisador) e lavada; E = Álamo pré-tratado por explosão a vapor e lavado; F. Álamo pré-tratado por explosão a vapor e não lavado. n.r. = Não relatado.

* Rendimento de conversão de glucana em glicose

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Bagaço de cana-de-açúcar

Três amostras de bagaço de cana foram caracterizadas neste trabalho: “A”, “B” e “C”. O bagaço “A” foi submetido a ensaios exploratórios quanto à granulometria, fracionamento e composição química das diferentes frações. O bagaço “B” não passou por etapa de fracionamento e foi analisado quanto à sua distribuição granulométrica e composição química. O bagaço “C” (amostra de referência) foi empregado em um estudo interlaboratorial para implementação da metodologia de análise composicional.

O bagaço “A” foi moído em moinho de martelo, e a fração de finos foi removida por via seca, utilizando fluxo de ar. O aparato utilizado consistiu em uma caixa de plástico na qual o fundo foi substituído por duas malhas de 20 mesh entrelaçadas (Figura 5).

Figura 5 - Visão geral (A), fundo (B) e perfil (C) da caixa utilizada para a remoção de finos por fluxo de ar.

Fonte: Arquivo pessoal

Para a remoção dos finos, 150 g de bagaço foram adicionados na caixa e, através de uma abertura (Figura 5C), foi injetado ar comprimido por 40 segundos. Após este tempo,

uma amostra de bagaço sem finos e outra de finos, recuperadas após o fracionamento, foram reservadas para a análise composicional e granulométrica.

O bagaço “B” também foi moído em moinho de martelo e a distribuição granulométrica do material integral e moído foi determinada.

O bagaço “C” foi utilizado na forma em que foi recebido.

3.1.1. Distribuição granulométrica

As análises granulométricas dos bagaços integral, moído e fracionado foram realizadas determinando-se as frações mássicas seletivamente retidas em um conjunto de peneiras padronizadas da série Tyler. As peneiras utilizadas foram 6, 10, 20, 35, 65 e 150 mesh, com aberturas de 3,35, 1,70, 0,85, 0,42, 0,21 e 0,11 mm, respectivamente. Para estas análises, foram utilizadas 20 g de amostra. As peneiras foram posicionadas em ordem decrescente de abertura das malhas, de modo que a primeira peneira foi aquela com malha de maior abertura e a última foi aquela com malha de menor abertura. O sistema de peneiras foi acoplado à um agitador magnético e, em seguida, a amostra de bagaço de cana foi adicionada à primeira peneira. A agitação do sistema foi feita durante 1h, em frequência máxima.

3.1.2. Implementação da metodologia de análise composicional

Para a implementação da metodologia empregada para a determinação da composição química do bagaço de cana-de-açúcar (apresentada com detalhes na seção seguinte), participou-se de um estudo interlaboratorial envolvendo 10 instituições: NREL (*National Renewable Energy Laboratory*), CENPES (Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello), CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol), CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), EMBRAPA AGROENERGIA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), INT (Instituto Nacional de Tecnologia), IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), IQ/UNESP (Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual de São Paulo), IQSC/USP

(Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo), além da EEL/USP (Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo).

O estudo consistiu na realização da análise composicional de uma amostra padrão de bagaço de cana-de-açúcar seca e moída a 20 mesh (bagaço “C”), e na descrição do método utilizado para a determinação dos componentes da amostra. Os integrantes do estudo utilizaram os próprios métodos analíticos para a determinação de extrativos em água e etanol, cinzas, glucana, xilana, arabinana, manana, lignina solúvel, lignina insolúvel e acetil.

Os resultados apresentados pelas instituições integrantes foram analisados estatisticamente pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), com base em norma internacional que estabelece rotinas para ensaios de proficiência (ISO 13528:2005), que atribuiu valores percentuais para cada componente a partir de uma média robusta calculada através da eliminação de *outliers*; os desvios-padrão robustos também foram calculados.

3.1.3. Análise composicional

As composições químicas das frações do bagaço “A” (bagaço moído sem finos e fração contendo apenas finos), do bagaço “B” (moído e não fracionado) e do bagaço de referência utilizado no estudo interlaboratorial descrito na seção anterior (bagaço “C”) foram determinadas seguindo a metodologia recomendada pelo NREL (SLUITER et al., 2010), com modificações, como segue:

Primeiramente, para determinação dos compostos extraíveis, o bagaço foi extraído com água por 24h, seguido de extração com etanol, por mais 24h, em Soxhlet. O cálculo da porcentagem de extrativos aquosos e alcóolicos foi baseado nas massas secas iniciais e determinadas após a extração do material. Os extratos alcóolicos e aquosos também foram analisados quanto à absorção de luz em espectrofotômetro na região do UV e do visível, e quanto ao teor de açúcares totais de acordo com o método proposto por Dubois et al. (1956).

Para a determinação de carboidratos estruturais, grupos acetila e lignina, a amostra (300 mg) foi inicialmente submetida à hidrólise com ácido sulfúrico em duas etapas: a primeira foi conduzida com H₂SO₄ 72% (m/m) a 30 °C, por 60 min. Após esta etapa, a

concentração ácida foi diluída para 4% com água deionizada (84 ml) e a mistura foi autoclavada a 121 °C, por 60 min. Paralelamente, uma solução padrão de açúcares com concentração ácida de 4% (denominada padrão de recuperação de açúcares) foi preparada e também submetida à autoclavagem, para determinar o percentual de degradação dos açúcares na etapa de pós-hidrólise. Esta degradação foi calculada baseada nas concentrações de açúcares determinadas antes e após a autoclavagem. Após a segunda hidrólise, o padrão de recuperação foi reservado para a determinação de açúcares e o material obtido da pós-hidrólise ácida do bagaço de cana foi filtrado em papel de filtro (poros de 20-25 μm). Uma alíquota do hidrolisado foi reservada para a quantificação dos carboidratos estruturais, dos grupos acetila, e da lignina solúvel em meio ácido. Os sólidos retidos no papel de filtro foram lavados com água deionizada e a sua massa foi determinada, após secagem a 105 °C, até massa constante. Este material foi então submetido à calcinação em mufla a 575 °C por 2 horas, para determinação do teor de cinzas insolúveis em meio ácido (também por gravimetria). Posteriormente, o teor de lignina insolúvel em meio ácido foi calculado pela diferença entre estas duas massas. O teor de lignina solúvel em meio ácido foi determinado no hidrolisado por meio de espectrofotometria na região UV do espectro (240 nm, $\epsilon = 25 \text{ L/g cm}$). O valor obtido foi somado ao teor de lignina insolúvel (determinado previamente), para o cálculo do teor de lignina total na amostra extraída. As concentrações de açúcares monoméricos e grupos acetila foram utilizadas no cálculo dos teores de açúcares poliméricos presentes na amostra extraída, empregando-se fatores de correção apropriados (0,88 para açúcares C₅, 0,90 para açúcares C₆, e 0,72 para grupos acetila). O teor de açúcares poliméricos no bagaço de cana *in natura* foi determinado considerando o teor de extrativos calculado previamente.

Por CLAE, as concentrações de glicose, manose, galactose, xilose e arabinose foram determinadas nas seguintes condições: coluna BIO RAD Aminex HPX 87P (300 x 7,8 mm), 85 °C, fase móvel água deionizada, fluxo de 0,6 mL/min, volume da amostra injetada de 20 μL . A concentração de ácido acético foi determinada na seguinte condição: coluna BIO RAD Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm) a 45 °C, fase móvel solução de ácido sulfúrico 0,01N, fluxo de 0,6 mL/min, volume da amostra injetada de 20 μL . As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtros Sep-Pak C18.

3.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H_2SO_4 diluído

Com o intuito de definir a condição de pré-tratamento mais apropriada para avaliar a integração entre a sacarificação e a fermentação dos sólidos pré-tratados, lavados ou não, na ausência ou presença do hidrolisado hemicelulósico, tendo como base a recuperação máxima de açúcares (glicose, xilose e arabinose), o bagaço de cana “B” moído foi submetido à pré-tratamentos com H_2SO_4 diluído em diferentes condições.

Os experimentos de pré-tratamento foram conduzidos em reator Parr (volume total de 8 L), com teor de sólidos em cada experimento de 10% (200g). A massa total de reação foi de 2 kg, incluindo água, ácido e bagaço. Inicialmente, o bagaço de cana foi intumescido, com o volume de água adequado em cada condição de pré-tratamento, de um dia para o outro. Após este período, o bagaço intumescido foi transferido para o reator e o volume de H_2SO_4 referente a cada condição de pré-tratamento foi adicionado à mistura reacional. Depois de carregado e fechado, o reator foi pressurizado a 10 bar, com N_2 , e submetido a agitação de 150 rpm.

Três condições operacionais de pré-tratamento foram avaliadas: 140 °C, 1% H_2SO_4 (equivalente a 100 mg de H_2SO_4 /g de bagaço), 20 min; 150 °C, 2% H_2SO_4 (equivalente a 200 mg de H_2SO_4 /g de bagaço), 30 min; e 160 °C, 3% H_2SO_4 (equivalente a 300 mg de H_2SO_4 /g de bagaço), 40 min. Ao final de cada pré-tratamento, o reator foi resfriado com banho de gelo e, em seguida, despressurizado.

Os perfis de temperatura versus tempo ao longo dos experimentos de pré-tratamento são apresentados na Figura 6.

Figura 6 - Perfis de temperatura observados durante os pré-tratamentos do bagaço de cana com H_2SO_4 diluído.

Fonte: Arquivo pessoal

Após cada experimento, o *slurry* foi pesado e, em seguida, separado por filtração em fração sólida (bagaço pré-tratado) e líquida (hidrolisado hemicelulósico). O hidrolisado teve o seu volume determinado e foi reservado para a determinação dos teores de sólidos solúveis e cinzas, além das concentrações de açúcares (glicose, xilose e arabinose), inibidores (furfural, HMF e ácido acético) e pH. O sólido pré-tratado foi lavado com 4L de água e, após lavagem, teve sua massa seca quantificada para a determinação do teor de sólidos insolúveis. A água utilizada para lavar os sólidos foi analisada da mesma forma que aquela empregada para o hidrolisado. Uma fração do sólido pré-tratado foi seca a temperatura ambiente e analisada quanto à sua composição química e estrutural.

3.2.1. Caracterização química e estrutural dos sólidos pré-tratados

Os bagaços pré-tratados e secos a temperatura ambiente, obtidos nas diferentes condições de pré-tratamento, foram analisados quanto à sua composição química e estrutural.

A composição química foi determinada seguindo a metodologia descrita no item 3.1.3, exceto pelo fato de que as amostras pré-tratadas não foram previamente extraídas.

A porosidade foi determinada pela técnica de termoporometria, realizada nos Laboratórios de Desenvolvimento de Processos do CTBE. Esta análise foi conduzida utilizando DSC (calorimetria diferencial de varredura), com técnica que consistiu em congelar as amostras úmidas (0,05 g) à -70°C, o que foi seguido pelo aumento gradual de temperatura com acompanhamento da quantidade de calor consumida na fusão da água retida nos poros de diferentes diâmetros. O resultado de cada análise foi representado pelo cumulativo de água (massa de gelo fundido/massa seca de amostra) em função do diâmetro de poros ($\emptyset$), calculado de acordo com a equação de Gibbs-Thomson, modificada (Eq. 1)

$$\emptyset = -2K_c x K/\Delta T \quad (1)$$

Onde $K_c = 10,81 \text{ nm} \times \text{K}$ (Kelvin) (DRIEMEIR et al. 2012) e ΔT representa a depressão higroscópica da temperatura de fusão da água.

A cristalinidade foi determinada pela técnica de difração de raios-X, realizada no Departamento de Engenharia de Materiais da EEL/USP, utilizando um difratômetro com tubo gerador de raios-X ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) no intervalo angular de 10-40° (2 θ) e passo angular de 0,02°. A partir dos difratogramas, o índice de cristalinidade foi calculado de acordo com a equação 2 (SEGAL et al., 1959).

$$I_c = ((I_{002} - I_{am})/I_{002}) \times 100 \quad (2)$$

Onde I_c representa o índice de cristalinidade (%); com I_{002} determinado quando $2\theta = 22,6^\circ$, e I_{am} quando $2\theta = 18,0^\circ$.

3.2.2. Sacarificação enzimática dos sólidos pré-tratados

A hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados e lavados foi realizada em condições otimizadas previamente (SANTOS et al., 2011), com modificações: em frasco Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio reacional, constituído por sólidos (10%), 10 mL de tampão citrato de sódio (125 mM, pH 4,8) com azida sódica 0,025%, enzimas

presentes no Extrato II (SANTOS et al., 2011) (10 FPU/g de bagaço) e Tween 20 (0,025 g/g de bagaço). Paralelamente, brancos de enzima (massa de sólidos substituída por água) e substrato (massa de enzima substituída por água) foram preparados.

Os frascos foram incubados a 45 °C, em shaker a 150 rpm. Nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas de hidrólise enzimática, foram retiradas alíquotas de 1 mL. Em seguida, essas amostras foram fervidas por 5 min e centrifugadas por 15 min, a 12.000 rpm. Os sobrenadantes foram analisados por CLAE.

O rendimento de conversão de glucana (R_{CG}) foi calculada de acordo com a equação 3.

$$R_{CG} = (((C_G \times V_R) \times 0,90) / M_I) \times 100 \quad (3)$$

Onde C_G é a concentração de glicose no meio reacional; V_R é o volume reacional; e M_I é a massa inicial de celulose adicionada à reação.

3.2.3. Caracterização química dos hidrolisados hemicelulósicos e das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados

As concentrações de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e ácido acético no hidrolisado e na água de lavagem foram determinadas por CLAE nas seguintes condições: coluna BIO RAD Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm), temperatura da coluna de 45 °C, fase móvel solução de ácido sulfúrico 0,01N, fluxo de 0,6 mL/min, volume da amostra injetada de 20 µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtros Sep-Pak C18. O eluente, antes do uso, foi filtrado à vácuo em membrana de 0,45 µm e, em seguida, degaseificado pela ação de ultra-som por 25 min sob vácuo.

As concentrações de furfural e HMF no hidrolisado e na água de lavagem também foram determinadas por CLAE, nas seguintes condições: coluna Resolve 5µm Spherical C18 (3,9 x 300 mm), temperatura da coluna de 25 °C, detector de ultravioleta SPD-10A UV-VIS, fase móvel solução de acetonitrila e água (1:8) com 1% de ácido acético (v/v), volume da amostra injetada de 20 µL. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm. O eluente foi filtrado à vácuo em membrana de 0,45 µm e em seguida degaseificado pela ação de ultrasom e vácuo por 10 min.

Para determinar a concentração de oligômeros, tanto no hidrolisado hemicelulósico quanto na água de lavagem, uma alíquota (10 mL) de amostra foi submetida a uma etapa de pós-hidrólise. Assim, a concentração de oligômeros na amostra foi calculada pela diferença entre a concentração de açúcares monoméricos obtidos na pós-hidrólise e a concentração de açúcares monoméricos contidos inicialmente no hidrolisado ou na água de lavagem. A pós-hidrólise foi realizada ajustando a concentração ácida da solução para 4% (m/m), sendo autoclavada a 121 °C por 60 min.

Os teores de sólidos solúveis no hidrolisado e na água de lavagem foram determinados por gravimetria (105°C), adicionando 2 g de amostra a cadinhos tarados. Após a secagem em estufa até massa constante, o teor de sólidos solúveis foi calculado a partir da diferença entre massa inicial e final. Os teores de cinzas também foram determinados, por gravimetria, após calcinação em mufla (575°C) dos sólidos solúveis secos a 105°C.

3.2.4. Fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos

Os hidrolisados hemicelulósicos obtidos após os pré-tratamentos do bagaço de cana nas condições operacionais descritas no item 3.2 foram fermentados empregando *S. stipitis* DSM 3651.

O inóculo foi preparado transferindo 1 mL de células (ressuspendidas a partir de cultivos em ágar extrato de malte) para frascos Erlenmeyer (500 mL) contendo 200 mL de meio sintético composto por 30 g/L de xilose, 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte e 5 g/L de peptona. Os meios foram incubados em shaker a 30 °C e 200 rpm durante 24 h. Após este tempo, as células foram recolhidas por centrifugação a 2000 rpm por 15 min e ressuspendidas em água destilada estéril.

As fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos após o pré-tratamento de bagaço de cana com H₂SO₄ diluído foram realizadas em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de meio inoculado com 3 g/L de células. Os meios foram compostos por hidrolisados suplementados com 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte e 5 g/L de peptona.

Os frascos foram incubados em shaker a 30°C e 200 rpm durante 120 h. Nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h de fermentação, alíquotas de 1 mL foram coletadas. As

amostras foram centrifugadas por 15 min a 12.000 rpm. A partir dos sobrenadantes, as concentrações de etanol e de açúcares foram determinadas por CLAE. Após lavagem e ressuspensão do precipitado em água destilada, a concentração de células foi determinada por turbidimetria, utilizando uma curva de calibração que correlaciona os valores de absorbância a 600 nm com a concentração celular em base seca.

Todos os hidrolisados tiveram o seu pH ajustado para 6 com NaOH (pellets) e, após filtração, foram esterilizados em autoclave a 111 °C por 15 min. Após a esterilização, os hidrolisados foram centrifugados assepticamente, para a remoção de precipitados, e então suplementados com os nutrientes supradescritos.

Os parâmetros fermentativos, fator de conversão de substrato (glicose + xilose) em produto (etanol), $Y_{P/S}$ (g/g), produtividade volumétrica, Q_p (g/L h), e eficiência de conversão, (η %), foram calculados de acordo com as equações 4 a 6, respectivamente.

$$Y_{P/S} = P_F / ((Gli_i + Xil_i) - (Gli_f + Xil_f)) \quad (4)$$

Onde P_F é a concentração máxima de etanol (g/L) obtida durante a fermentação; Gli_i e Xil_i são as concentrações de glicose e xilose (g/L), respectivamente, determinadas no início da fermentação, e Gli_f e Xil_f são as concentrações dos respectivos açúcares (g/L), determinadas ao final da fermentação.

$$Q_P = P_F / t \quad (5)$$

Onde P_F é a concentração máxima de etanol (g/L) obtida durante a fermentação; t é o tempo (min) onde foi observado máxima produção de etanol.

$$\eta = (Y_{P/S} / 0,51) \times 100 \quad (6)$$

Onde $Y_{P/S}$ é fator de conversão de substrato em produto obtido experimentalmente; e 0,51 é o valor teórico do fator de conversão de glicose/xilose em etanol (g/g).

3.2.5. Determinação dos balanços de massa e rendimentos de recuperação de açúcares

O balanço de massa para sólidos totais foi determinado pela relação entre a massa seca de bagaço de cana adicionada ao reator em cada condição de pré-tratamento e as massas secas de sólidos solúveis e insolúveis, determinadas nas frações líquida (água de lavagem e hidrolisado) e sólida (sólidos lavados), respectivamente.

O balanço de massa para componentes polissacarídicos (glucana, xilana e arabinana) foi calculado a partir das massas secas destes componentes no bagaço *in natura* e nas frações sólida (sólidos lavados) e líquida (hidrolisado hemicelulósico e água de lavagem).

O rendimento de recuperação de glicose, xilose e arabinose, após o pré-tratamento do bagaço de cana e a hidrólise enzimática do sólido pré-tratado, foi calculado a partir das concentrações destes açúcares e respectivos volumes das frações líquidas, considerando os valores máximos teóricos determinados com base na composição do material de partida.

3.2.6. Avaliação da reprodutibilidade do pré-tratamento na condição de menor severidade

Após definida a condição de pré-tratamento mais apropriada para a realização dos experimentos subsequentes (140 °C, 1% H₂SO₄, 20 min), o pré-tratamento foi avaliado quanto à reprodutibilidade experimental, em triplicatas.

O experimento foi realizado e analisado de forma idêntica àquela descrita previamente (item 3.2), incluindo a determinação do balanço para massa total e a quantificação de lignina solúvel no hidrolisado hemicelulósico (até então não analisados).

Para a determinação do balanço de massa total, o *slurry* obtido após o pré-tratamento foi separado por filtração em fração sólida e líquida, e a massa seca dos sólidos pré-tratados não lavados, bem como o volume de hidrolisado hemicelulósico, foram determinados e comparados com a massa reacional inicial.

A quantificação de lignina solúvel no hidrolisado hemicelulósico foi feita conforme descrito no item 3.1.3.

3.3. Integração entre sacarificação e fermentação

3.3.1. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico (FHH), em separado da sacarificação do sólido pré-tratado e da fermentação do hidrolisado celulósico, separadas (SHF)

3.3.1.1. Destoxificação e fermentação do hidrolisado hemicelulósico

O hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento do bagaço de cana (140°C, 1% H₂SO₄, 20 min) foi submetido a ensaios de destoxificação com ditionito de sódio e lacase.

Para a destoxificação com ditionito de sódio, frações de 50 mL de hidrolisado foram submetidas a reação com ditionito de sódio (10 e 15 mM, pH 4,8), à 25 °C por 60 min; os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, agitados manualmente.

Para a destoxificação com lacase, frações de 50 mL de hidrolisado foram submetidas a reação com lacase comercial (0,5 e 1,0 U/mL, pH 4,8), a 25 °C por 24h; os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, sob agitação de 150 rpm.

Para os dois métodos de destoxificação, as concentrações de açúcares (glicose, xilose, arabinose), lignina solúvel, ácido acético, furfural e HMF foram determinadas antes e após o tratamento, conforme descrito no item 3.1.3. Após a remoção de precipitados, por centrifugação, os hidrolisados destoxificados foram submetidos a ensaios de fermentação conforme descrito no item 3.2.4.; à exceção de que os hidrolisados não foram submetidos a autoclavagem.

3.3.1.2. Condicionamento e hidrólise enzimática do sólido pré-tratado, lavado (SL) e não lavado (SNL)

O sólido pré-tratado, lavado (SL) e não lavado (SNL), foi submetido a ensaios de condicionamento; com lacase, na carga de 1,0 U/mL.

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 125 mL, com 50 mL de mistura reacional. O teor de sólidos insolúveis foi ajustado para 6 % (valor determinado no *slurry* obtido após o pré-tratamento a 140 °C), por meio da ressuspensão do sólido, lavado e não lavado, em tampão citrato 50 mM (pH 4,8; ajustado com NaOH 6M, quando da utilização de SNL).

Os frascos foram incubados a 25 °C por 24h, sob agitação de 150 rpm. Após o tratamento, a mistura reacional foi fervida em banho-maria por 5 min, para inativação da enzima. A fração sólida foi recuperada por centrifugação, e submetida à hidrólise enzimática conforme descrito no item 3.2.2.; à exceção de que, quando da utilização de SNL, o acompanhamento da conversão de glucana em glicose considerou a concentração de glicose proveniente do hidrolisado hemicelulósico (por meio de experimento controle, sem adição de celulasas).

3.3.1.3. Fermentação do hidrolisado celulósico

Para SL e SNL não condicionados, os hidrolisados celulósicos obtidos após as sacarificações foram recuperados por centrifugação (4.500 rpm, 15 min), e submetidos a fermentação conforme descrito no item 3.2.4.; à exceção de que os hidrolisados não foram submetidos a autoclavagem.

3.3.1.4. Eficiência de produção de etanol: FHH + SHF

A eficiência de conversão dos açúcares em etanol durante a conversão SHF foi calculada a partir da massa de etanol produzida após a fermentação do hidrolisado

celulósico, comparada à massa de etanol potencial determinada com base no conteúdo de açúcares presente na matéria-prima. Considerou-se, nas determinações, as perdas de massas determinadas após as separações sólido/líquido (pré-tratamento e hidrólise enzimática) e após a neutralização do hidrolisado hemicelulósico. A eficiência de conversão dos açúcares em etanol durante a conversão FHH foi calculada de maneira semelhante àquela descrita para a conversão SHF; tendo como base os valores de 1,111 g/g (conversão de hexosanas em hexoses), 1,136 g/g (conversão de pentosanas em pentoses) e 0,511 g/g (conversão de hexoses e pentoses em etanol).

Fluxogramas que descrevem os experimentos e as respectivas eficiências de conversão são apresentados nos Apêndices A-D.

3.3.2. Efeitos da temperatura e do pH

O sólido pré-tratado lavado (SL) foi submetido à hidrólise enzimática em diferentes combinações de temperatura (30 ou 45 °C) e pH (6,0 ou 4,8); conforme descrito no item 3.2.2.

O hidrolisado hemicelulósico foi submetido à fermentação, nas mesmas combinações de temperatura e pH supradescritas; conforme descrito no item 3.2.4.

3.3.3. Sacarificação do sólido pré-tratado, em separado da co-fermentação dos hidrolisados celulósico e hemicelulósico (SHCF)

O *slurry* obtido após o pré-tratamento foi submetido a ensaios de sacarificação seguida de fermentação. Para isso, três estratégias de conversão foram avaliadas: neutralização (pH 4,8), pré-suplementação, e destoxificação (lacase), previamente à hidrólise enzimática. A conversão de *slurry* destoxificado em configuração híbrida, com pré-sacarificação por 24h, também foi avaliada. Estes ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer com capacidade de 125 mL com 50 mL de *slurry*, que foi reconstituído misturando sólido pré-tratado não lavado e hidrolisado hemicelulósico na mesma proporção obtida após o pré-tratamento (6% de sólidos insolúveis).

Para o experimento de conversão de *slurry* neutralizado, inicialmente o pH do meio foi ajustado para 4,8 (NaOH 6M) e incubado em shaker (150 rpm) por 24h à 25°C, seguido pela adição de celulasas (10 FPU/g bagaço) e sacarificação conforme descrito no item 3.3.1.2; à exceção de que hidrolisado hemicelulósico foi utilizado em lugar de solução tampão, e, ao final da hidrólise, o meio foi fervido para a inativação de celulasas, teve o pH ajustado para 6,0 (NaOH 6M), e foi suplementado e inoculado conforme descrito no item 3.2.4.

O experimento de conversão de *slurry* com pré-suplementação foi conduzido e analisado de forma semelhante àquela descrita para o experimento de conversão de *slurry* neutralizado; exceto pela adição prévia do suplemento nutricional (3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte e 5 g/L de peptona) à mistura reacional após o ajuste do pH em 4,8 - previamente à hidrólise enzimática.

O experimento de conversão de *slurry* destoxificado com lacase foi conduzido e analisado conforme descrito para o experimento de conversão do *slurry* neutralizado; exceto pela adição de lacase ao meio (1U/mL) após o ajuste de pH em 4,8. Após 24h de destoxificação a 25 °C sob agitação de 150 rpm, a mistura reacional foi fervida para a inativação da enzima, previamente à sacarificação e fermentação.

O experimento de conversão de *slurry* destoxificado em configuração híbrida foi realizado de forma idêntica àquela descrita para o experimento de conversão de *slurry* destoxificado com lacase; à exceção de que a hidrólise enzimática do *slurry* destoxificado foi conduzida por um período de apenas 24h, sem inativação da celulase previamente à fermentação.

Fluxogramas que descrevem os experimentos e as respectivas eficiências de conversão são apresentados nos Apêndices E-H.

3.3.3.1. Eficiência de produção de etanol: SHCF

A eficiência de conversão dos açúcares em etanol durante a conversão SHCF foi calculada a partir da massa de etanol produzida após a fermentação dos hidrolisados celulósico e hemicelulósico, comparada à massa de etanol potencial determinada com base no conteúdo de açúcares presente na matéria-prima. Considerou-se, nas determinações,

massa constante de mistura reacional durante as conversões (50 mL), com concentração de etanol na fração sólida idêntica à concentração de etanol na fração líquida ($\rho = 1,0 \text{ g/mL}$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Bagaço de cana-de-açúcar

4.1.1. Implementação da metodologia de análise composicional

A média percentual dos componentes do bagaço “C”, conforme determinado na EEL/USP, assim como o valor atribuído pelo INMETRO, obtido a partir dos dados gerados pelos laboratórios participantes, e respectivos desvios-padrão, são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Teores percentuais dos componentes do bagaço de cana-de-açúcar “C” determinados na EEL/USP e valores atribuídos a cada componente pelo INMETRO.

Componente	Valor determinado (%)	Valor atribuído (%)	Desvio-padrão (%)
	EEL/USP	INMETRO	(INMETRO)
Extrativos em água	4,82	4,58	0,46
Extrativos em álcool	1,55	2,15	2,21
Glucana	41,43	41,66	2,38
Xilana	20,74	22,03	2,34
Arabinana	2,27	2,23	0,27
Galactana	0,00	0,77	0,84
Manana	0,00	0,25	0,23
Acetil	3,59	3,52	1,23
Lignina solúvel	3,74	3,76	2,44
Lignina insolúvel	18,92	18,71	0,69
Cinzas	1,80	1,50	0,29
Total	98,86	101,16	

Os teores de todos os componentes do bagaço de cana determinados na EEL/USP mostram que a metodologia empregada para a análise composicional do bagaço de cana, com adaptações em relação à metodologia preconizada pelo NREL, levou aos resultados

esperados com base na composição atribuída pelo INMETRO (média e desvios-padrão robustos).

4.1.2. Moagem, fracionamento e caracterização do bagaço “A”

O bagaço “A” foi moído em moinho de martelo e as distribuições granulométricas da biomassa antes e após a moagem são apresentadas na Figura 7.

Figura 7 -Distribuição granulométrica do bagaço de cana “A” integral e moído em moinho de martelo.

Fonte: Arquivo pessoal

Observa-se que a distribuição granulométrica do bagaço integral, antes da moagem, é heterogênea quanto ao tamanho de partículas, como observado por Driemeier et al. (2011), utilizando bagaço de origem diferente. Observa-se também que a estratégia de moagem foi eficiente na redução da proporção de partículas de maiores tamanhos, retidas nas peneiras de maiores aberturas (3,35 e 1,70 mm), contribuindo para a homogeneização da biomassa quanto ao tamanho de partículas. O cumulativo em massa das frações de bagaço retidas em peneiras com aberturas variando entre 0,85 e 0,11 mm totalizou 86,3%.

A redução do tamanho de partículas é uma estratégia comumente empregada antes de submeter a biomassa à tratamentos termoquímicos. Os métodos de redução, bem como o tamanho das partículas submetidas aos diferentes pré-tratamentos, entretanto, são variáveis. Por exemplo: Canilha et al. (2011), antes de submeter bagaço de cana à pré-tratamento com H_2SO_4 diluído, relataram que a biomassa foi moída a granulometria inferior a 20 mesh (0,85 mm). Gamez et al. (2006) moeram e peneiraram bagaço de cana à granulometria inferior a 35 mesh (0,42 mm) antes de pré-tratamento com ácido fosfórico. Hernandez-Salas et al. (2009) moeram bagaço de cana-de-açúcar em moinho de facas e selecionaram a fração com granulometria entre 10 (1,68 mm) e 100 mesh (0,152 mm) antes de submetê-lo à pré-tratamento com HCl diluído. Alternativamente, Pietrobon et al. (2011), antes de submeter bagaço de cana à pré-tratamento com H_2SO_4 diluído e/ou $\text{Ca}(\text{OH})_2$, diminuíram a heterogeneidade granulométrica empregando uma separação em peneiras, apenas removendo as frações de maiores tamanhos (5,6 mm). Estes dados mostram que, de forma geral, o tamanho de partículas do bagaço é reduzido antes do pré-tratamento, empregando estratégias variadas; entretanto, não há uma faixa de granulometria definida como mais apropriada.

Outrossim, Lavarack et al. (2002), avaliando o emprego de bagaço moído e bagacilho (finos removidos por fluxo de ar) no pré-tratamento com H_2SO_4 diluído, observaram uma ligeira variação na taxa de solubilização de xilana entre as duas frações, sendo que a solubilização de xilana em bagacilho foi levemente mais rápida do que em bagaço; estatisticamente, entretanto, o efeito do tamanho de partículas não foi significativo. Hsu et al. (1996), avaliando diferentes tamanhos de partículas (3 e 10 mm) de *switchgrass* em pré-tratamento com H_2SO_4 diluído em escala piloto, também relataram que o tamanho de partículas não influenciou a eficiência de pré-tratamento em termos de composição de sólidos pré-tratados e hidrolisados hemicelulósicos; entretanto, houve favorecimento do rendimento de hidrólise enzimática quando o sólido pré-tratado foi submetido à redução do tamanho de partículas.

A fração de finos no bagaço “A” moído foi removida por fluxo de ar, com o auxílio do aparato mostrado na Figura 5, e as distribuições granulométricas, tanto do bagaço moído sem finos quanto da fração de finos recuperada após o fracionamento, são apresentadas na Figura 8.

Figura 8 - Distribuição granulométrica do bagaço de cana “A” moído em moinho de martelo sem finos e da fração de finos.

Fonte: Arquivo pessoal

Os dados de distribuição granulométrica do bagaço moído sem finos demonstram diminuição das frações mássicas retidas nas frações de menores tamanhos (0,11 mm e fundo), em relação ao bagaço moído não fracionado. Entretanto, os dados de distribuição granulométrica da fração de finos mostram que a remoção destas partículas não foi seletiva; 67% da massa total ficou retida em peneiras com aberturas de 0,42 e 0,21 mm.

As frações de bagaço de cana supramencionadas foram submetidas à extração com água seguida de etanol por 48 horas (24 horas em cada solvente, sendo que os solventes foram substituídos a cada 12 horas). Na sequência, realizou-se uma varredura de absorção de luz pelos extratos aquosos e alcoólicos, na região do visível e do ultravioleta (Figura 9).

Figura 9 - Perfil de absorção de luz por extratos aquosos e alcóolicos provenientes das frações do bagaço de cana “A” sem finos (A) e contendo apenas finos (B).

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Figura 9, os perfis de absorção de luz dos extratos aquosos e alcoólicos das amostras do bagaço “A” sem finos (A) e da fração contendo apenas finos (B) são similares. Observa-se também que a absorção de luz pelos extratos aquosos e alcoólicos, para ambas as amostras, ocorre prioritariamente na região do UV (200 a 400 nm); e que os picos das primeiras 12 horas de extração com água e etanol, para ambas as amostras, são mais acentuados do que aqueles observados nos extratos provenientes das

segundas extrações. Estes dados mostram que os solventes aqui empregados solubilizam compostos diferentes, e que a extração com água seguida de etanol é importante para a adequada remoção de compostos não estruturais. De acordo com Browning (1967), a extração com solventes orgânicos, como etanol, solubiliza ácidos graxos, ceras e materiais corantes; os compostos extraíveis em água são sais inorgânicos, açúcares e algumas substâncias fenólicas.

Após a extração, as amostras foram submetidas à análise composicional. As composições químicas quanto aos teores percentuais de extrativos, glucana, xilana, arabinana, acetil, lignina e cinzas, do bagaço sem finos e da fração contendo apenas finos, são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Composição química das frações do bagaço de cana “A” sem finos e contendo somente finos

Componente (%)	Bagaço sem finos	Somente finos
Extrativos em água	4,7 ± 0,7	12,2 ± 1,0
Extrativos em álcool	1,1 ± 0,1	2,6 ± 1,6
Glucana	43,7 ± 1,2	44,6 ± 0,5
Xilana	20,9 ± 0,8	14,3 ± 0,1
Arabinana	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,0
Lignina solúvel	3,7 ± 0,1	3,1 ± 0,2
Lignina insolúvel	17,3 ± 0,4	11,8 ± 1,2
Acetil	3,5 ± 0,3	2,2 ± 0,0
Cinzas	1,7 ± 0,4	5,9 ± 0,4
Total	98,3	98,6

Conforme pode ser observado, as composições químicas das diferentes frações são diferentes. Em termos de significância estatística ($p < 0,05$), determinadas pelo teste de Tukey, as principais diferenças entre os componentes do bagaço sem finos e da fração contendo apenas finos se referem aos teores de extrativos em água, xilana, lignina insolúvel e cinzas. O teor de lignina insolúvel determinado na fração contendo apenas finos (11,8%) foi menor do que aquele determinado para o bagaço sem finos (17,3%). Os teores de extrativos em água e cinzas, por sua vez, foram mais elevados na fração contendo apenas finos (12,2 e 5,9%, respectivamente), em relação àqueles determinados para o bagaço sem finos (4,7 e 1,7%, respectivamente).

As diferenças entre os teores de extrativos das diferentes frações granulométricas do bagaço de cana corroboram com os dados apresentados por Sanjuan et al. (2001). Estes autores, avaliando a composição química de fibras e finos desta biomassa, relataram que as principais diferenças composicionais foram relacionadas aos elevados teores de cinzas e extrativos solúveis em água observados na fração de finos (5,4 e 10,3 %, respectivamente) em comparação àqueles observados na fração de fibras (1,1% e 1,1%, respectivamente).

Os extratos aquosos e alcoólicos das amostras supramencionadas também foram avaliados quanto aos teores de açúcares totais, pelo método proposto por Dubois et al. (1956). Para o bagaço sem finos, a quantidade de açúcares totais recuperada nos extratos foi de 2,5% (m/m); já para a fração contendo somente finos, a quantidade foi mais elevada, de 5,9% (m/m).

As diferentes composições das diferentes frações granulométricas do bagaço de cana podem influenciar o processamento da biomassa em etanol. Teores elevados de cinzas na fração contendo apenas finos podem, por exemplo, desempenhar ação tamponante em reações em meio ácido, como o pré-tratamento com H_2SO_4 diluído (LINDE et al., 2006). Neste contexto, Esteghlalian et al. (1997) determinaram a habilidade neutralizante de forragem de milho, *switchgrass* e álamo, avaliando os valores de pH de soluções de H_2SO_4 diluído antes e após misturar as soluções com as biomassas. Estes autores relataram que gramíneas têm habilidade neutralizante mais alta (43,7 e 25,8 mg H_2SO_4 /g para forragem de milho e para *switchgrass*, respectivamente) do que coníferas (16,7 mg H_2SO_4 /g para álamo), e atribuíram este comportamento aos elevados teores de cinzas determinados em forragem de milho (7,1%) e *switchgrass* (7,2 %), em comparação àquele determinado para álamo (1,3%).

Conforme já exposto, boa parte dos compostos solúveis em água, observados em maior quantidade na fração de finos, são açúcares extra fibra. De acordo com Bower et al. (2008), estes açúcares, como sacarose e seus monossacarídeos constituintes (glicose e frutose), são facilmente degradados sob determinadas condições de hidrólise ácida; sendo que o aumento da severidade do pré-tratamento implica na sua degradação à compostos que comprometem a etapa de fermentação, como HMF, ácido fórmico e ácido levulínico.

Ademais, diferentes teores de lignina nas diferentes frações granulométricas do bagaço de cana também podem influenciar a reatividade da biomassa à sacarificação enzimática. O trabalho realizado por Siqueira et al. (2011) mostrou que, além da composição química, as reatividades das frações de finos e de fibras à sacarificação enzimática são diferentes. Foi observado que a porção “medula” do colmo da cana-de-

açúcar é rica em células de parênquima, menos lignificadas (12%) e mais reativas à hidrólise enzimática, em relação à porção “córtex” (19% de lignina), onde vasos e fibras são predominantes. Zheng et al. (2011) também relataram diferenças entre a composição química de “medula” e “córtex” de caule de milho; os autores verificaram que o teor de lignina é mais alto no “córtex” (24,4%) do que na “medula” (18,7%); e, ainda, que o teor de cinzas na “medula” (4,4%) é mais alto do que aquele determinado no córtex (3,1%).

As diferenças observadas na composição das diferentes frações granulométricas do bagaço de cana-de-açúcar, e o modo como tais diferenças influenciam o pré-tratamento com H_2SO_4 diluído, indicam que o fracionamento da biomassa previamente ao pré-tratamento pode ser vantajoso.

4.1.3. Moagem e caracterização do bagaço “B”

O bagaço “B” foi moído em moinho de martelo e as distribuições granulométricas das duas amostras, representativas do material integral e do material moído, são ilustradas na Figura 10.

Figura 10 - Distribuição granulométrica do bagaço de cana “B”, integral e moído em moinho de martelo.

Fonte: Arquivo pessoal

Assim como para o bagaço “A”, a distribuição granulométrica do bagaço integral “B” se mostrou heterogênea quanto ao tamanho de partículas, tendo sido observada retenção de 28,0 % da massa em peneiras de maiores aberturas (3,35 e 1,70 mm). Novamente, a estratégia de moagem foi eficiente na redução da heterogeneidade do tamanho, levando à retenção de 93,4% da massa em peneiras com aberturas entre 0,85 e 0,11 mm.

A composição química do bagaço “B”, quanto aos teores percentuais de extrativos, glucana, xilana, arabinana, acetil, lignina e cinzas, é apresentada na Tabela 9, assim como dados de composição de diferentes amostras de bagaço de cana determinados por diferentes autores.

Tabela 9 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar "B", em comparação a valores reportados na literatura

Componente (%)	Este trabalho	Milne, 1992	Seabra, 2010	Templeton, 2010	Canilha, 2011
Extrativos em água	5,4± 0,0	n.r	n.r	n.r	n.r
Extrativos em álcool	1,3± 0,3	n.r	n.r	n.r	n.r
Extrativos totais	6,7	4,4	4,6	5,7	8,5
Glucana	41,1± 0,4	38,6	39,5	39,0	44,9
Xilana	22,8± 0,5	20,4	21,9	21,8	22,2
Arabinana	2,4± 0,2	1,7	1,8	1,8	1,1
Galactana	0,0	0,6	0,7	0,8	n.r
Acetil	3,4± 0,2	n.r	3,4	3,3	2,6
Lignina solúvel	3,5± 0,3	n.r	n.r	n.r	5,2
Lignina insolúvel	16,7± 0,5	n.r	n.r	n.r	14,1
Lignina total	20,2	23,1	25,1	24,8	19,3
Cinzas totais	7,8± 0,5	4,0	2,2	3,9	1,4

n.r – não reportado

Os dados mostram que os teores dos componentes do bagaço de cana “B” estão dentro da faixa de variação observada na literatura, exceto pelo elevado teor de cinzas (7,8%); que, entretanto, ficou próximo daqueles determinados para *switchgrass* (7,2%) e forragem de milho (7,1%), conforme reportado na literatura (ESTEGHLALIAN et al., 1997).

Neste contexto, é preciso mencionar que a comparação de composições químicas de diferentes materiais lignocelulósicos, reportadas por diferentes autores, deve ser realizada com cautela, uma vez que, além da diversidade de métodos analíticos utilizados para a determinação dos componentes percentuais, as condições de cultivo e processamento destes materiais também variam amplamente (HAMES et al., 2003). Sendo assim, a utilização de amostras de referência, como aquela cuja composição foi apresentada no item 4.1.1., se faz necessária para a prévia validação de protocolos analíticos.

4.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído

4.2.1. Caracterização química e estrutural dos sólidos pré-tratados

As composições químicas dos sólidos pré-tratados obtidos nas diferentes condições de pré-tratamento são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Composição química dos sólidos pré-tratados obtidos nas diferentes condições de pré-tratamento

Condição de pré-tratamento			Sólido pré-tratado					
T	H ₂ SO ₄	T	Glucana	Xilana	Arabinana	Lignina	Acetila	Cinzas
(°C)	(% m/m)	(min)	(% m/m)	(% m/m)	(% m/m)	(% m/m)	(% m/m)	(% m/m)
140	1	20	65,5	0,0	0,0	30,3	0,0	4,6
150	2	30	56,4	0,0	0,0	39,0	0,0	5,8
160	3	40	41,4	0,0	0,0	54,5	0,0	3,2

De acordo com os dados apresentados na Tabela 10, é possível observar que os teores percentuais de glucana e lignina nos sólidos pré-tratados variaram de 41,4 a 65,5 % (m/m) e de 30,3 a 54,5 % (m/m). Observa-se também que o pré-tratamento do bagaço com H₂SO₄ diluído, conduzido nas três condições operacionais aqui avaliadas, promoveu a remoção completa da fração hemicelulósica (xilana, arabinana e acetila), dando origem a sólidos pré-tratados constituídos, basicamente, por glucana e lignina.

A remoção da hemicelulose presente na parede celular de biomassas lignocelulósicas é o principal efeito de pré-tratamentos catalisados com ácidos. Isto porque, em meio ácido, dos três componentes principais que perfazem a parede celular de lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina), a hemicelulose é mais susceptível à hidrólise, devido à sua estrutura amorfa e com baixo grau de polimerização. Estas propriedades conferem à hemicelulose menor estabilidade química e térmica em relação à celulose, que, por sua vez, tem estrutura compacta e cristalina (FENGEL; WEGENER, 1989). Quanto à lignina, o pré-tratamento com ácidos diluídos provoca efeitos como modificação estrutural e redistribuição sobre os sólidos pré-tratados, com pequena extração deste componente (SILVERSTEIN et al., 2007).

A completa remoção da fração de hemicelulose nos sólidos pré-tratados obtidos no presente estudo pode estar relacionada com as altas cargas de ácido empregadas nas três condições operacionais de pré-tratamento. Por exemplo, a carga de ácido empregada na condição mais branda de hidrólise (1% H_2SO_4) equivale a 100 mg de H_2SO_4 /g de bagaço. Schell et al (2003), avaliando o pré-tratamento de forragem de milho em escala piloto com altos teores de sólidos (20 %), relataram o emprego de cargas de H_2SO_4 bem mais baixas (5 a 14 mg de H_2SO_4 / g forragem de milho). Além disso, as elevadas severidades podem estar associadas às longas rampas de aquecimento do reator, observadas para as três condições operacionais de pré-tratamento avaliadas (Figura 6).

A Figura 11 mostra a aparência visual de amostras do bagaço de cana antes e após as diferentes condições de pré-tratamento.

Figura 11 - Fotografias dos bagaços in natura (1) e pré-tratados a 140°C, 1% H₂SO₄, 20 min (2), 150°C, 2% H₂SO₄, 30 min (3) e 160°C, 3% H₂SO₄, 40 min (4).

Fonte: Arquivo pessoal

Conforme pode ser observado, há diferenças nítidas tanto entre os bagaços pré-tratados quanto entre estes e o bagaço *in natura*. O bagaço *in natura* caracteriza-se por possuir partículas grandes e cor clara, enquanto os bagaços pré-tratados possuem partículas menores e coloração variável, progressivamente mais escura conforme o aumento da severidade da condição de pré-tratamento.

Esteves e Carvalho (2013), avaliando a distribuição do tamanho de partículas de bagaço de cana durante o pré-tratamento com H₂SO₄ diluído em reator piloto aquecido por vapor direto, observaram que, em todas as condições operacionais avaliadas, houve redução do tamanho de partículas do material.

Amostras dos diferentes bagaços foram submetidas à análise de porosidade pela técnica de termoporometria. A Figura 12 apresenta os valores de volume cumulativo de água congelável (A) e área superficial acessível (B) em função do diâmetro de poros nas amostras *in natura* e pré-tratadas.

Figura 12 - Volumes cumulativos de água congelável (A) e áreas superficiais acessíveis (B) dos bagaços *in natura* e pré-tratados nas diferentes condições, determinados com base nas massas de água congelável. Massas de água não congelável: 140°C (0,26 g/g); 150°C (0,24 g/g); 160°C (0,15 g/g); *in natura* (0,22 g/g).

Fonte: Arquivo pessoal

Os dados contidos na Figura 12 mostram que, em relação ao bagaço *in natura*, houve um aumento da porosidade do material após as três condições de pré-tratamento avaliadas. Entretanto, não foi observada diferença significativa entre as porosidades dos

bagaços pré-tratados. Considerando a água não congelável, confinada em poros com diâmetros inferiores a 0,66 nm, verificou-se que o menor valor foi observado para o bagaço pré-tratado na condição mais drástica (160 °C, 3% H₂SO₄, 40 min).

Ishizawa et al. (2007) avaliaram o efeito da porosidade na digestibilidade enzimática de amostras selecionadas de forragem de milho, pré-tratadas com H₂SO₄ diluído em condições otimizadas. Os autores também verificaram que houve um aumento na porosidade do material após o pré-tratamento, mas não houve diferenças significativas entre os materiais pré-tratados nas condições avaliadas.

As amostras de bagaço *in natura* e pré-tratadas também foram submetidas à análise do perfil de difração de raios-X, com o intuito de verificar a existência de diferenças qualitativas (perfis dos difratogramas) e quantitativas (índices de cristalinidade) na estrutura cristalina dos materiais (Figura 13).

Figura 13 - Difratogramas de raios-X dos bagaços de cana *in natura* e pré-tratados nas diferentes condições de pré-tratamento.

Fonte: Arquivo pessoal

Conforme pode ser observado, o perfil de difração de raios X exibido pelo bagaço *in natura* diferiu daqueles exibidos pelos bagaços pré-tratados; estes, entretanto, apresentaram certo grau de superposição. Os índices de cristalinidade (I_c), dos bagaços *in*

natura e pré-tratados sob condições progressivamente mais severas, foram de 56,1; 68,1; 65,9 e 52,5%, respectivamente.

O aumento no índice de cristalinidade do material após o pré-tratamento na condição menos severa (140 °C, 1% H₂SO₄, 20 min) pode ser justificado pela remoção de componentes amorfos, como hemicelulose; já a posterior redução deste parâmetro, observada nas condições mais severas de pré-tratamento, pode ter decorrido da “amorfização” de celulose cristalina (Hsu et al., 2010).

4.2.2. Sacarificação enzimática dos sólidos pré-tratados

A Figura 14 mostra os rendimentos de sacarificação enzimática dos sólidos pré-tratados, e as respectivas concentrações de glicose, obtidos nas diferentes condições de pré-tratamento.

Figura 14 - Rendimento de sacarificação enzimática dos sólidos pré-tratados nas diferentes condições de pré-tratamento (A) e concentração de glicose (B), em função do tempo de hidrólise.

Fonte: Arquivo pessoal

Conforme pode ser observado, os rendimentos de sacarificação variaram de 56,3 a 71,1 % após 72 h de hidrólise. Observa-se também que a máxima conversão de glucana em glicose foi alcançada empregando o bagaço obtido na condição mais severa de pré-tratamento (160 °C, 3% H₂SO₄, 40 min). Entretanto, a concentração de glicose determinada após 72 h de hidrólise para o sólido pré-tratado à 160 °C foi mais baixa (32,7 g/L) do que a concentração de glicose determinada após o mesmo tempo para o sólido pré-tratado à 140°C (40 g/L). Isto porque a condição mais severa de pré-tratamento acarretou em remoção de glucana, conforme apresentado na Tabela 10; o pré-tratamento conduzido

na condição mais branda, por sua vez, preservou a glucana presente no sólido pré-tratado, e apesar de apresentar menor digestibilidade enzimática, permitiu a obtenção de maior concentração de glicose.

As condições de pré-tratamento aqui avaliadas foram baseadas em um estudo prévio (ESTEVES, 2011), no qual diferentes condições de pré-tratamento com H_2SO_4 diluído foram avaliadas em um reator de 100 L aquecido por vapor direto. A composição e o rendimento de sacarificação enzimática dos sólidos pré-tratados obtidos no referido estudo encontram-se compilados na Tabela 11.

Tabela 11 - Composição e rendimento de sacarificação de sólidos pré-tratados obtidos em diferentes condições de pré-tratamento de bagaço de cana com H_2SO_4 diluído (ESTEVES, 2011)

Condição de pré-tratamento			Esteves (2011)			
T	H_2SO_4	T	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Hidrólise enzimática (72 h)
(°C)	(% m/m)	(min)	(% m/m)			(%)
140	1	20	53,5	14,5	23,5	36,6
150	2	30	62,0	5,5	29,5	60,1
160	3	40	59,7	0,1	35,5	87,7

Conforme pode ser observado, a composição e o rendimento de hidrólise enzimática dos sólidos provenientes do pré-tratamento em reator de 100 L (Tabela 11) são bastante diferentes daqueles obtidos no reator de 2 gal (Tabela 10 e Figura 14), mesmo empregando as mesmas condições de pré-tratamento.

Degenstein et al (2011), avaliando a performance de um reator de bancada com aquecimento e resfriamento rápidos, mostraram que a eficiência de hidrólise enzimática de forragem de milho pré-tratada com H_2SO_4 diluído foi similar àquela observada em reatores apropriados para aplicação em escala industrial.

Como o sistema de aquecimento do reator de 2 gal (forno externo, aquecido por resistência elétrica) implicou em longas rampas de aquecimento (Figura 6), postula-se que, para as “mesmas condições de pré-tratamento”, houve aumento da severidade a ponto de promover alterações indesejáveis na composição e estrutura dos sólidos pré-tratados. Tal hipótese é corroborada pelas concentrações bem maiores de lignina observadas nos materiais pré-tratados sob condições "mais severas" (Tabela 10). Supõe-se que, no presente estudo, houve intensa formação de pseudo-lignina (SANNIGRAHI et al., 2011), o que pode prejudicar a eficiência de hidrólise enzimática. Ademais, é preciso mencionar

também que, em condições de alta severidade, podem ocorrer reações de reversão de açúcares (HARRIS et al., 1985), levando à formação de oligossacarídeos e outros produtos de reação recalcitrantes à hidrólise enzimática.

4.2.3. Composição dos hidrolisados hemicelulósicos e das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados

As composições químicas dos hidrolisados hemicelulósicos e das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados são mostradas na Tabela 12.

Tabela 12 - Composição dos hidrolisados hemicelulósicos e das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados obtidos nas diferentes condições de pré-tratamento

Componentes	Hidrolisado hemicelulósico			Água de lavagem		
	1*	2**	3***	1*	2**	3***
Glicose (g/L)						
<i>Monomérica</i>	4,5	7,0	4,5	0,9	1,1	0,5
<i>Oligomérica</i>	0,2	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
Xilose (g/L)						
<i>Monomérica</i>	22,1	15,9	4,0	4,4	2,6	0,5
<i>Oligomérica</i>	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0
Arabinose (g/L)						
<i>Monomérica</i>	2,5	1,9	0,5	0,5	0,3	0,1
<i>Oligomérica</i>	0,2	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
Ácido acético (g/L)	4,3	4,6	4,9	0,9	0,8	0,8
Furanos (g/L)						
Furfural	1,3	5,0	5,6	0,3	0,7	0,9
HMF	0,6	1,2	0,5	0,1	0,1	0,1
Lignina solúvel	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Sólidos solúveis (m/m)	3,4	4,7	5,7	0,7	0,9	0,6
Cinzas (m/m)	1,3	0,9	1,1	0,0	0,0	0,0

1* - 140 °C, 1% H₂SO₄, 20 min; 2** - 150 °C, 2 % H₂SO₄, 30 min; 3***- 160 °C, 3 % H₂SO₄, 40 min; n.d – não determinado

Assim como observado para a composição química dos bagaços pré-tratados, a composição química dos hidrolisados hemicelulósicos também variou de acordo com as

condições de pré-tratamento. A máxima concentração de xilose (22,1 g/L; exclusivamente monômero) foi observada no hidrolisado obtido na condição mais branda de pré-tratamento; a mínima (4,3 g/L; 4,0 g/L de xilose na forma monomérica e 0,3 g/L de xilose na forma oligomérica), no hidrolisado obtido na condição mais severa de pré-tratamento.

Apesar de exercer efeito positivo na eficiência de hidrólise enzimática dos sólidos pré-tratados (Figura 14), o aumento da severidade do pré-tratamento prejudicou a recuperação de açúcares no hidrolisado hemicelulósico (Tabela 12), elevando a concentração dos respectivos produtos de degradação nos hidrolisados. Por exemplo, a concentração de furfural determinada no hidrolisado obtido na condição mais severa de pré-tratamento foi de 5,6 g/L; na condição mais branda, de 1,3 g/L.

Neureiter et al. (2002), avaliando o efeito de diferentes condições de pré-tratamento de bagaço de cana com H_2SO_4 diluído na composição do hidrolisado hemicelulósico, observaram que a condição de pré-tratamento com severidade mais alta gerou um hidrolisado com alta concentração de furfural (4,52 g/L), em relação à concentração deste produto no hidrolisado obtido na condição de severidade mais branda (0,04 g/L). Wang et al. (2011) reportaram comportamento similar durante o pré-tratamento de sabugo de milho com H_2SO_4 diluído; por exemplo, o aumento da concentração ácida, de 1,1 para 2,2 % à 170°C, acarretou no aumento da concentração de furfural no hidrolisado hemicelulósico de 5,0 para 7,5 g/L.

Quanto à composição das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados, pode-se observar a presença de açúcares (glicose, xilose e arabinose), em pequenas concentrações. Embora relativamente pequenas, tais concentrações equivalem a aproximadamente 15, 11 e 5 % da massa de açúcares contidos no bagaço de cana (pré-tratamentos conduzidos a 140°C, 150°C e 160°C, respectivamente).

Embora a lavagem dos sólidos após o pré-tratamento seja uma estratégia empregada para remover compostos solúveis que podem comprometer a hidrólise enzimática, como açúcares, derivados de lignina, furanos e ácidos orgânicos (JING et al., 2009), a fração líquida gerada é muito diluída e requer concentração significativa para que os açúcares possam ser utilizados na produção de etanol.

4.2.4. Fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos

Os hidrolisados hemicelulósicos obtidos nas diferentes condições de pré-tratamento foram fermentados a etanol, e os dados referentes à concentração, rendimento e produtividade são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Concentração, rendimento e produtividade determinados durante a fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos após os pré-tratamentos de bagaço de cana com H₂SO₄ diluído

Condição de pré-tratamento			Etanol	Rendimento	Produtividade	Eficiência
T	H ₂ SO ₄	T	P _F	Y _{P/S}	Q _P	η
(°C)	(% m/m)	(min)	(g/L)	(g/g)	(g/L.h)	(%)
140	1	20	7,94	0,34	0,07	66,7
150	2	30	0,00	0,00	0,00	0,00
160	3	40	0,00	0,00	0,00	0,00

Entre os hidrolisados, o único onde foi observada produção de etanol foi aquele obtido na condição mais branda de pré-tratamento, alcançando 0,34 g/g de rendimento e 0,07 g/L.h de produtividade. A fermentação dos hidrolisados obtidos nas demais condições de pré-tratamento (150°C, 2% H₂SO₄ e 30 min, e 160°C, 3% H₂SO₄ e 40 min) foi completamente inibida, não sendo observada produção de etanol nem mesmo após 120 h de fermentação.

Como ilustrado na Tabela 12, a composição dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos nas diferentes condições de pré-tratamento diferencia-se tanto nas concentrações de açúcares quanto nas concentrações de compostos inibitórios. Postula-se que as altas concentrações de furfural observadas nos hidrolisados obtidos sob condições mais severas, em adição aos demais compostos inibitórios, inibiram completamente a produção de etanol por *S. stipitis* DSM 3651. Diaz et al. (2009), por exemplo, relataram inibição completa da fermentação de xilose em etanol quando *S. stipitis* foi cultivada na presença de furfural (4 g/L). Além do furfural (e do HMF), compostos fenólicos derivados da lignina e ácidos orgânicos, também presentes nos hidrolisados hemicelulósicos, exercem efeitos inibitórios na fermentação (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000); sendo os efeitos destes

compostos dependentes das suas concentrações e das suas naturezas químicas, exibindo interações entre si (BELLIDO et al., 2011; DIAZ et al., 2009).

4.2.5. Determinação dos balanços de massa e rendimentos de recuperação de açúcares

A Tabela 14 apresenta os balanços de massa para sólidos, solúveis (nas frações líquidas - água de lavagem e hidrolisado) e insolúveis (bagaço pré-tratado), assim como para carboidratos, monoméricos e oligoméricos, recuperados nas respectivas frações, em relação ao material de partida.

Tabela 14 - Balanço de massa para carboidratos recuperados nas frações obtidas após os pré-tratamentos do bagaço de cana com H₂SO₄ diluído

Massa recuperada (% m/m)	140°C-1% H ₂ SO ₄ -20min		150°C-2% H ₂ SO ₄ -30min		160°C-3% H ₂ SO ₄ -40min	
	SPT ¹	HH ² +AL ³	SPT ¹	HH ² +AL ³	SPT ¹	HH ² +AL ³
Sólidos insolúveis	57,0	-	49,4	-	46,6	-
Sólidos solúveis	-	28,3	-	40,5	-	49,0
Glucana	90,9	8,3	67,9	12,7	47,0	9,2
Xilana	0,0	70,5	0,0	50,7	0,0	14,6
Arabinana	0,0	80,5	0,0	57,5	0,0	24,1

1-Sólido pré-tratado, 2- Hidrolisado hemicelulósico, 3- Água de lavagem

De acordo com a Tabela 14, a recuperação de sólidos insolúveis após o pré-tratamento conduzido na condição mais branda (140°C, 1% H₂SO₄, 20 min) foi maior (57,0%) do que quando o pré-tratamento foi conduzido a 160°C, 3% H₂SO₄, 40 min (46,6%); as recuperações de sólidos solúveis foram de 28,3 e 49,0% (m/m), respectivamente. Com relação às máximas recuperações de glucana (como polissacarídeo insolúvel), e de xilana e arabinana (como mono e oligossacarídeos solúveis), verificou-se que estas foram alcançadas na condição mais branda de pré-tratamento.

A Tabela 15, por sua vez, apresenta os rendimentos de recuperação de açúcares monoméricos determinados após as etapas de pré-tratamento (hidrolisado hemicelulósico e água de lavagem) e hidrólise enzimática (hidrolisado celulósico), em relação ao bagaço *in natura*.

Tabela 15 - Rendimento de recuperação de glicose, xilose e arabinose após o pré-tratamento com H₂SO₄ diluído e a hidrólise enzimática

Condição de pré-tratamento			Pré-tratamento (PT)			PT + Hidrólise enzimática		
T (°C)	H ₂ SO ₄ (% m/m)	T (min)	Glicose (%)	Xilose (%)	Arabinose (%)	Glicose (%)	Xilose (%)	Arabinose (%)
140	1	20	7,9	69,8	77,0	55,1	69,8	77,0
150	2	30	12,5	50,7	57,6	55,7	50,7	57,6
160	3	40	8,5	14,0	19,0	41,9	14,0	19,0

Conforme pode ser observado, o rendimento de recuperação de açúcares monoméricos após o pré-tratamento mais a hidrólise enzimática foi maior na condição mais branda de pré-tratamento; apesar do maior rendimento de sacarificação enzimática observado para o sólido pré-tratado na condição mais severa de pré-tratamento (71,1%; Figura 14), houve considerável perda de glucana nesta condição (43,8%; Tabela 14), o que levou a um baixo rendimento de recuperação de glicose monomérica em relação ao material *in natura* (41,9%; Tabela 15).

Também é válido ressaltar, em complementação ao exposto anteriormente, que, Lloyd e Wyman (2005), avaliando o efeito de condições operacionais de pré-tratamento (temperatura, ácido e tempo) na recuperação de glicose e xilose após o pré-tratamento e a hidrólise enzimática de forragem de milho, demonstraram que as recuperações máximas de xilose e glicose foram alcançadas em condições de pré-tratamento diferentes; uma maior recuperação de xilose após o pré-tratamento demandou a condução desta etapa em condições mais brandas, enquanto o rendimento máximo de glicose após a hidrólise enzimática foi alcançado conduzindo o pré-tratamento em condições mais severas (os experimentos foram conduzidos em reator cilíndrico de pequeno diâmetro, com aquecimento e resfriamento rápidos). E que a recuperação combinada de glicose e xilose após o pré-tratamento com H₂SO₄ diluído e a hidrólise com enzimas pode alcançar valores próximos do máximo teórico (ELANDER et al., 2009), havendo a necessidade de estudos subsequentes para a definição de condições mais apropriadas de pré-tratamento.

4.2.6. Avaliação da reprodutibilidade do pré-tratamento na condição de menor severidade

A condição de pré-tratamento selecionada para os experimentos subsequentes, visando à avaliação da integração entre sacarificação e fermentação do sólido pré-tratado, lavado ou não, na presença ou ausência do hidrolisado hemicelulósico (140°C, 1% H₂SO₄, 20 min), foi avaliada quanto à reprodutibilidade experimental, sendo conduzida em triplicata.

4.2.6.1. Composição dos sólidos pré-tratados

A composição química dos sólidos pré-tratados é apresentada na Tabela 16.

Tabela 16. Composição química dos sólidos pré-tratados a 140°C e 1% H₂SO₄ por 20 min

Componente	Conteúdo (% m/m)
Glucana	63,9 ± 0,6
Xilana	0,0
Arabinana	0,0
Lignina	29,3 ± 0,4
Acetil	0,0
Cinzas	5,0 ± 0,3

Conforme pode ser observado, os resultados foram condizentes com aqueles observados anteriormente (Tabela 10). Novamente, a fração de hemicelulose (xilana, arabinana e acetila) foi completamente removida durante o pré-tratamento, gerando um sólido composto basicamente por glucana (63,9%) e lignina (29,3%).

4.2.6.2. Composição dos hidrolisados hemicelulósicos e das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados

As composições químicas dos hidrolisados hemicelulósicos e das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados são apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17 - Composição química dos hidrolisados hemicelulósicos e das águas de lavagem dos sólidos pré-tratados, obtida após os pré-tratamentos do bagaço de cana a 140°C e 1% H₂SO₄ por 20 min

Componentes	Hidrolisado hemicelulósico	Água de lavagem
Glicose (g/L)		
<i>Monomérica</i>	4,4 ± 0,2	0,6 ± 0,1
<i>Oligomérica</i>	0,3 ± 0,0	0,0
Xilose (g/L)		
<i>Monomérica</i>	21,7 ± 0,2	3,3 ± 0,5
<i>Oligomérica</i>	0,0	0,0
Arabinose (g/L)		
<i>Monomérica</i>	2,5 ± 0,0	0,4 ± 0,1
<i>Oligomérica</i>	0,4 ± 0,0	0,0
Ácido acético (g/L)	4,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Furanos (g/L)		
Furfural	1,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0
HMF	0,5 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Lignina solúvel (g/L)	3,8 ± 0,2	0,8 ± 0,0
Sólidos solúveis (% m/m)	3,3 ± 0,0	0,6 ± 0,0
Cinzas (% m/m)	1,2 ± 0,1	0,0

Assim como observado para a composição dos sólidos pré-tratados, a composição do hidrolisado hemicelulósico (Tabela 17) foi semelhante àquela determinada no experimento executado para a definição da condição de pré-tratamento mais apropriada (Tabela 12). Por exemplo, as concentrações de glicose, xilose e arabinose determinadas no primeiro conjunto de experimentos foram iguais a 4,5, 22,1 e 2,5 g/L, respectivamente; aquelas determinadas no segundo conjunto de experimentos, 4,4, 21,7 e 2,5 g/L.

A composição da água de lavagem dos sólidos pré-tratados no experimento de reprodutibilidade também foi similar àquela determinada no experimento de definição da condição de pré-tratamento. Por exemplo, as concentrações de glicose, xilose e arabinose

determinadas no experimento de definição das condições de pré-tratamento foram de 0,9, 4,4 e 0,5 g/L, respectivamente; no experimento de avaliação da reprodutibilidade experimental, de 0,6, 3,3 e 0,4 g/L.

4.2.6.3. Determinação dos balanços de massa e rendimentos de recuperação de açúcares

Os balanços de massa determinados para massa total, de sólidos e de polissacarídeos, considerando as massas recuperadas após o pré-tratamento, são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Balanços de massa para diferentes componentes, determinados após os pré-tratamentos do bagaço de cana a 140°C e 1% H₂SO₄ por 20 min

Componentes (% m/m)	140°C-1% H ₂ SO ₄ -20 min		
	SPT ¹	HH ²	AL ³
Sólidos insolúveis	57,6±0,6	-	-
Sólidos solúveis	-	18,0±0,7	11,3±1,8
Glucana	89,6 ± 1,2	5,7±0,3	2,8±0,4
Xilana	0,0	46,6 ± 2,9	25,2±3,7
Arabinana	0,0	58,9 ± 3,7	28,6±4,3

1-Sólido pré-tratado, 2- Hidrolisado hemicelulósico, 3- Água de lavagem

De acordo com os dados, o balanço de massa para sólidos totais – insolúveis e solúveis - (86,9%) foi próximo àquele obtido no experimento de definição da condição de pré-tratamento, 85,3% (Tabela 14). Comportamento semelhante foi observado para o balanço de massa dos principais componentes polissacarídicos do bagaço (glucana e xilana), que, no experimento inicial, apresentou valores de 99,2 e 70,5%, respectivamente; a exceção ficou com o balanço de massa para arabinana, um pouco maior que o esperado com base no primeiro pré-tratamento.

O balanço de massa total, referente à proporção entre a massa retirada e a massa introduzida no reator, foi de 92,3%, demonstrando uma perda de massa de 7,7%, provavelmente devido à formação de compostos voláteis.

Os rendimentos de recuperação de açúcares monoméricos determinados após as etapas de pré-tratamento (hidrolisado hemicelulósico e água de lavagem) e hidrólise

enzimática (hidrolisado celulósico), calculados em relação às respectivas massas no material de partida, são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Rendimento de recuperação de glicose, xilose e arabinose após o pré-tratamento com H₂SO₄ diluído e a hidrólise enzimática

Condição de pré-tratamento			Pré-tratamento (PT)			PT + Hidrólise enzimática		
T	H ₂ SO ₄	t	Glicose	Xilose	Arabinose	Glicose	Xilose	Arabinose
(°C)	(% m/m)	(min)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
140	1	20	8,1±0,2	71,7±1,3	78,8±1,5	58,7±0,9	71,7±1,3	78,8±1,5

Conforme pode ser observado, quando comparados àqueles obtidos no experimento de definição da condição de pré-tratamento (55,1; 69,8 e 77,0%, respectivamente; Tabela 15), verifica-se que foram semelhantes; embora bastante distantes dos máximos teóricos.

4.3. Integração entre sacarificação e fermentação

4.3.1. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico (FHH), em separado da sacarificação do sólido pré-tratado e da fermentação do hidrolisado celulósico, separadas (SHF)

4.3.1.1. Destoxificação e fermentação do hidrolisado hemicelulósico

As composições dos hidrolisados hemicelulósicos, não destoxificado e destoxificados com lacase (0,5 e 1,0 U/mL) ou ditionito de sódio (10 e 15 mM), são apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20 - Composição química dos hidrolisados hemicelulósicos, não destoxificado e destoxificados com lacase e ditionito de sódio

Componentes (g/L)	Não-destoxificado	Lacase		Ditionito de sódio	
		0,5 U/mL	1,0 U/mL	10 mM	15 mM
Glicose	4,4	3,9	3,9	4,0	4,1
Xilose	21,7	20,1	20,2	20,8	21,2
Arabinose	2,5	2,3	2,3	2,3	2,4
Ácido acético	4,6	4,7	4,5	4,4	4,4
Furanos	1,6	1,6	1,5	1,5	1,4
Lignina solúvel	3,8 (*4,9)	2,5	2,3	3,2	2,9

*Concentração determinada no tempo 0 h de tratamento com lacase

Como pode ser observado, a destoxificação com lacase ou ditionito de sódio, independente das cargas avaliadas, não alterou significativamente as concentrações de açúcares (glicose, xilose e arabinose), ácido acético e furanos. No entanto, foram observadas reduções na concentração de lignina solúvel: de 49,0 e 53,0 % nos hidrolisados destoxificados com lacase (0,5 e 1,0 U/mL, respectivamente); e de 15,8 e 23,7% nos hidrolisados destoxificados com ditionito de sódio (10 e 15 mM, respectivamente).

As concentrações de xilose, células e etanol observadas durante as fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos, não destoxificado e destoxificados com lacase (0,5 e 1,0 U/mL) ou ditionito de sódio (10 e 15 mM), são apresentadas na Figura 15.

Figura 15 - Concentrações de xilose (A), células (B) e etanol (C) determinadas durante as fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos; não-destoxificado e destoxificados com lacase ou ditionito de sódio.

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com os dados apresentados na Figura 15, os perfis de consumo de xilose (A) variaram substancialmente; sendo o mais lento aquele observado no hidrolisado não destoxificado (pH ajustado para 6 com NaOH). A destoxificação com lacase, em ambas as cargas (0,5 e 1,0 U/ml), promoveu aumento significativo na velocidade de consumo de xilose, sendo completamente esgotada em 48 h. A destoxificação com ditionito de sódio, por outro lado, melhorou apenas um pouco a velocidade de consumo deste açúcar, sendo observado consumo completo em 72-96 h.

Quanto a produção de etanol (C), as fermentações dos hidrolisados destoxificados com lacase levaram a maiores (8,3 e 9,3 g/L) e mais rápidas produções de etanol, em relação a fermentação do hidrolisado não-destoxificado (7,9 g/L).

A Tabela 21 apresenta os parâmetros de fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos, destoxificados e não destoxificado.

Tabela 21 - Produção (P_F), rendimento ($Y_{P/S}$), produtividade (Q_P) e eficiência determinados durante a fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos destoxificados e não destoxificado

Hidrolisado / Destoxificação	P_F (g/L)	Tempo (h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L h)	η (%)
Não destoxificado	7,9	120	0,34	0,07	66,9
Lacase (0,5 U/mL)	8,3	48	0,34	0,15	66,3
Lacase (1,0 U/mL)	9,3	48	0,40	0,19	79,1
Ditionito de sódio (10 mM)	7,2	96	0,30	0,09	59,6
Ditionito de sódio (15 mM)	6,2	96	0,28	0,06	54,9

Observa-se que a destoxificação com lacase aumentou, principalmente, a produtividade volumétrica de etanol; embora os demais parâmetros fermentativos também tenham sido maximizados. Os melhores resultados foram obtidos quando a destoxificação foi feita com a maior carga enzimática; 1,0 U/mL.

A destoxificação do hidrolisado com ditionito de sódio, por sua vez, apesar de também ter promovido diminuição na concentração de lignina solúvel, provocou efeitos negativos nos parâmetros fermentativos em relação àqueles determinados no hidrolisado não destoxificado (condicionado apenas pelo ajuste de pH).

Chandel et al. (2007), avaliando diferentes métodos de destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, também reportaram aumento na produção de etanol quando o hidrolisado foi destoxificado com lacase (1 U/mL); de 3,5 g/L (hidrolisado neutralizado à pH 5,5) para 6,5 g/L, associado a um aumento de 2 vezes na

produtividade volumétrica de etanol. Os autores atribuíram a melhora nos parâmetros fermentativos à redução na concentração de compostos fenólicos (77,5 %), uma vez que a destoxificação não afetou as concentrações de furanos e ácido acético.

4.3.1.2. Condicionamento e hidrólise enzimática do sólido pré-tratado, lavado (SL) e não lavado (SNL)

A Figura 16 apresenta as eficiências de sacarificação da glucana contida no sólido pré-tratado a 140 °C, lavado (SL) e não lavado (SNL), não condicionado (NC) e condicionado (C) com lacase (1,0 U/mL), em função do tempo de hidrólise.

Figura 16 - Eficiências de conversão de glucana do sólido pré-tratado a 140 °C, lavado (SL) e não lavado (SNL), não condicionado (NC) e condicionado (C) com lacase (1 U/mL), em função do tempo de hidrólise.

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Figura 16, a eficiência de conversão determinada para SNL/NC após 72 h de hidrólise foi de 43,3 %; 23,1 % inferior àquela determinada para SL/NC (56,3%). Tal comportamento pode ser atribuído à presença de compostos solúveis contidos

no hidrolisado hemicelulósico impregnado no bagaço pré-tratado, sendo a composição (g/L) do meio reacional determinada para SNL/NC no início da hidrólise enzimática: glicose (2,0), xilose (8,8), arabinose (1,0), ácido acético (1,7), furfural (0,1), HMF (0,2) e lignina solúvel (2,5).

Sabe-se que as atividades das enzimas envolvidas na conversão de celulose em glicose podem ser inibidas por diferentes compostos; açúcares e compostos fenólicos são os principais. Hodge et al. (2008), por exemplo, estudando a sacarificação enzimática de forragem de milho pré-tratada com ácido sulfúrico diluído, atribuíram aos açúcares solúveis (124,9 g/L, como monômeros; 15,9 g/L como oligômeros) o papel de principal agente inibidor da hidrólise enzimática; em presença de hidrolisado contendo 15,5 g/L de ácido acético, 9,1 g/L de lignina solúvel e 7,9 g/L de furanos. Jing et al. (2009), por outro lado, avaliando a inibição de enzimas presentes em um coquetel celulolítico comercial por compostos solúveis comumente encontrados em hidrolisados hemicelulósicos e etanol, relataram que compostos fenólicos (derivados de lignina) exercem efeitos inibitórios mais pronunciados do que furanos, ácidos orgânicos e etanol, nesta ordem. Estas constatações foram determinadas tendo como base a relação entre K_m (constante de saturação) e K_i (constante de inibição); quanto maior este índice, maior é a inibição pelo composto (vanilina e hidroxibenzaldeído, por exemplo, apresentaram índices de 15,9 e 10,6; etanol, de apenas 1,0).

Como mostrado na Figura 16, o condicionamento dos sólidos lavados previamente a hidrólise enzimática (SL/C) prejudicou a sacarificação da glucana, sendo observado rendimento de 38,0% em 72 h; menor, inclusive, que aquele observado durante a sacarificação de SNL/NC. Por outro lado, o condicionamento dos sólidos não lavados melhorou a sacarificação da glucana, permitindo a obtenção de rendimento similar àquele observado para SL/NC; devido à extração de compostos solúveis, conforme comprovado em experimento controle não adicionado de lacase (rendimento de sacarificação de 56,0% em 72h).

Conforme já mencionado, o condicionamento de sólidos pré-tratados com lacases depende da natureza do material lignocelulósico, da natureza da enzima e das condições operacionais. Moilanen et al. (2012), por exemplo, observaram melhora da digestão enzimática de *spruce* (12%), mas piora da digestão enzimática de *giant reed* (17%), após pré-tratamento termoquímico catalisado por SO_2 .

4.3.1.3. Fermentação do hidrolisado celulósico

Para SL/NC e SNL/NC, os hidrolisados celulósicos obtidos ao final das hidrólises enzimáticas foram submetidos a fermentação alcoólica (Figura 17).

Figura 17 - Concentrações de glicose, xilose, células e etanol determinadas durante as fermentações dos hidrolisados celulósicos; SL/NC (A), e SNL/NC (B).

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Figura 17, a glicose disponível (34,5 g/L) no hidrolisado celulósico obtido a partir do material lavado (SL-NC) foi totalmente consumida em 24h; a produção de etanol, determinada no mesmo tempo, foi de 15,5 g/L. O hidrolisado obtido a

partir do material não lavado (SNL-NC) foi composto por glicose (31,4 g/L), xilose (9,6 g/L) e arabinose (1,3 g/L), além de ácido acético (1,7 g/L). Assim como para a fermentação do hidrolisado obtido a partir de material lavado, a glicose foi consumida em 24h; restando apenas 2,3 g/L. O consumo de xilose pela levedura esgotou-se após 48h; tempo no qual foi observada máxima produção de etanol (17,9 g/L).

A Tabela 22 apresenta os parâmetros determinados para as fermentações dos hidrolisados celulósicos.

Tabela 22 - Produção (P_F), rendimento ($Y_{P/S}$), produtividade (Q_P) e eficiência determinados durante a fermentação dos hidrolisados celulósicos obtidos a partir de sólidos lavados (SL/NC) e não-lavados (SNL/NC)

Hidrolisado celulósico	P_F (g/L)	Tempo (h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L h)	η (%)
SL- NC	15,5	24	0,44	0,64	88,1
SNL - NC	17,9	48	0,44	0,37	86,7

Conforme pode ser verificado, uma maior produção de etanol foi observada durante a fermentação do hidrolisado preparado a partir do material não lavado. Os fatores de conversão de substrato em produto foram semelhantes para as duas fermentações. Já a produtividade volumétrica determinada para a fermentação do hidrolisado preparado a partir do material lavado foi muito maior que aquela determinada para a fermentação do hidrolisado preparado a partir do material não lavado.

De acordo com Agbogbo et al. (2006), em *S. stipitis*, a glicose é consumida preferencialmente à xilose; ademais, o consumo de glicose é mais rápido que o consumo de xilose. Consequentemente, a produtividade da fermentação do hidrolisado composto apenas por glicose foi maior que a produtividade da fermentação do hidrolisado composto por glicose e xilose; embora a produção de etanol tenha sido maior no hidrolisado proveniente de SNL.

Sabe-se que a co-fermentação de glicose e xilose por *S. stipitis* é comprometida, devido à inibição do consumo de xilose na presença de glicose, atribuída principalmente à competição no transporte destes açúcares (WEIERSTALL et al., 1999); além disso, em presença de glicose, a síntese de enzimas envolvidas na conversão de xilose (xilose redutase e xilitol desidrogenase) é reprimida (BICHO et al., 1988).

Sabe-se também que a condução do cultivo no modo batelada alimentada consiste em uma estratégia que pode ser utilizada para favorecer o co-consumo de glicose e xilose

(OLOFSSON et al., 2008). Neste contexto, é válido mencionar que Erdei et al. (2012) demonstraram a possibilidade de co-fermentação de glicose e xilose por uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para consumo de xilose, utilizando configuração SHCF em modo batelada alimentada durante a conversão; a fermentação foi iniciada com hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo, obtido após pré-tratamento termoquímico catalisado com H_2SO_4 , e alimentada com hidrolisado celulósico, preparado a partir de sólidos lavados (utilizou-se elevado teor de sólidos durante a sacarificação). Os açúcares contidos na água de lavagem foram incorporados ao hidrolisado hemicelulósico, e o hidrolisado celulósico, misturado a um hidrolisado de amido de trigo, com alta concentração de glicose, adicionado ao meio de fermentação de forma controlada para estimular o consumo de xilose. A configuração utilizada durante a conversão permitiu não apenas promover co-consumo de glicose e xilose, mas também integrar processos de produção de etanol de 1ª e 2ª gerações, em configuração que permite o reciclo de células (remoção de sólidos previamente à fermentação); ademais, a utilização de elevada concentração celular inicial se mostrou importante para diminuir o tempo de conversão.

4.3.1.4. Eficiência de produção de etanol: FHH + SHF

A Tabela 23 apresenta as eficiências e os tempos de conversão dos açúcares contidos nos sólidos pré-tratados, lavado e não-lavado, por SHF, e nos hidrolisados hemicelulósicos, destoxificado e não destoxificado, por FHH, em etanol, conduzidas separadamente.

Tabela 23 – Eficiências e tempos de conversão dos açúcares do bagaço de cana em etanol (FHH + SHF)

Configuração	Tempo (h)	Eficiência (%)*
SHF / Sólido lavado	96	9,4
SHF / Sólido não-lavado	120	13,7
FHH / Hidrolisado não destoxificado	120	12,5
FHH / Hidrolisado destoxificado	48	14,7

*com base na conversão teórica dos açúcares presentes no bagaço de cana in natura em etanol

Conforme pode ser observado, a eficiência de conversão dos açúcares contidos no sólido lavado, por SHF, foi inferior (9,4 %) àquela determinada empregando sólidos não

lavados (13,7%). Isto porque, como discutido anteriormente, a lavagem dos sólidos após o pré-tratamento, apesar de favorecer a etapa de sacarificação, devido à remoção de compostos inibidores, diminui a quantidade de açúcares disponíveis para a fermentação. Apesar de contribuir para o aumento da eficiência de conversão, o uso de SNL requer 24h adicionais de processo, para a fermentação da xilose presente no hidrolisado (Figura 17).

Quanto à fermentação do hidrolisado hemicelulósico (FHH), a estratégia de destoxificação com lacase também foi benéfica para o aumento da eficiência de conversão em etanol; de 12,5 para 14,7%. Entretanto, o efeito da destoxificação foi mais pronunciado no tempo de conversão; sendo que a estratégia permitiu a redução de 72h de processo.

Conjuntamente, a eficiência de conversão dos açúcares contidos nos hidrolisados hemicelulósico e celulósico, utilizando a configuração “fermentação do hidrolisado hemicelulósico (FHH), em separado da sacarificação do sólido pré-tratado e da fermentação do hidrolisado celulósico, separadas (SHF)” chegou a 28,4% do máximo teórico, devido à destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, e a não lavagem dos sólidos pré-tratados. O tempo total de conversão nesta configuração foi de 168 h; 120 h (72 h de hidrólise + 48 h de fermentação) para SHF, e 48 h para FHH.

A melhor eficiência de conversão obtida utilizando a configuração “fermentação do hidrolisado hemicelulósico (FHH), em separado da sacarificação do sólido pré-tratado e da fermentação do hidrolisado celulósico, separadas (SHF)”, 28,4%, ainda está muito distante do máximo teórico. Alfani et al. (2000), por exemplo, avaliando a conversão de palha de trigo em etanol, relataram rendimento de 81% do máximo teórico (por grama de biomassa), em 96h de conversão (72h de hidrólise e 24h de fermentação). Esta baixa eficiência de conversão pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao pré-tratamento, que, embora tenha levado a alta recuperação de açúcares, resultou em glucana recalcitrante à sacarificação enzimática. Ademais, considerando que as separações sólido-líquido acarretaram em “perda” de açúcares, supôs-se que o uso de *slurry* integral no processo de conversão poderia contribuir para o aumento da produção de etanol; além de simplificar e integrar etapas, tal estratégia permitiria aproveitamento completo dos açúcares disponíveis e, como consequência, aumentaria a eficiência de conversão, conforme demonstrado por Jung et al. (2013).

4.3.2. Efeitos da temperatura e do pH

Utilizando diferentes combinações de temperatura e pH, incluindo os valores tidos como ótimos para sacarificação (45 °C, pH 4,8) e para fermentação (30 °C, pH 6,0), o sólido pré-tratado lavado foi submetido à hidrólise enzimática; o hidrolisado hemicelulósico, à fermentação (Figura 18).

Figura 18 - Eficiência de sacarificação enzimática da glucana contida no sólido pré-tratado lavado (SL) (A) e produção de etanol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico (B), em diferentes combinações de temperatura e pH.

De acordo com a Figura 18, observa-se que tanto a temperatura quanto o pH influenciaram a eficiência de hidrólise na sacarificação (A) e a produção de etanol na fermentação (B).

Nas condições ótimas de temperatura (45 °C) e pH (4,8) para a sacarificação enzimática, foi possível alcançar rendimento de conversão de 56,3% após 72 horas de hidrólise. Entretanto, ao conduzir a hidrólise enzimática em pH 6,0, ideal para a fermentação, foi observada uma diminuição na eficiência de conversão da glucana em glicose de 10%; uma diminuição ainda mais drástica foi observada ao diminuir a temperatura para 30°C.

Quanto à etapa de fermentação, pode-se observar que as fermentações conduzidas em condições diferentes das ótimas (30 °C, pH 6,0) foram praticamente inibidas; não sendo observado consumo de açúcares e nem crescimento celular nos experimentos conduzidos a 30 °C e pH 4,8, 45 °C e pH 6,0, e 45 °C e pH 4,8. A produção de etanol durante a fermentação conduzida a 30 °C e pH 6,0 alcançou 7,9 g/L após 120 horas de cultivo.

No contexto da integração entre as etapas de sacarificação e de fermentação, no que concerne as configurações SSF e SSCF, idealmente, as condições operacionais devem atender às exigências do microrganismo empregado na fermentação. Entretanto, como demonstrado na Figura 19, a sacarificação da glucana é prejudicada significativamente nas condições adequadas para a fermentação. Entre as estratégias que podem ser empregadas para contornar este problema, como já mencionado, pode-se citar o emprego de microrganismos termotolerantes (BALLESTEROS et al., 1991) e a utilização de configurações híbridas (ZHANG et al., 2010; MESA et al., 2011).

4.3.3. Sacarificação do sólido pré-tratado, em separado da co-fermentação dos hidrolisados celulósico e hemicelulósico (SHCF)

A Figura 19 apresenta as concentrações de glicose e xilose (sacarificação) e de etanol (fermentação) determinadas durante as conversões dos *slurries*; neutralizado, pré-suplementado, e destoxificado, em configuração híbrida e não híbrida.

Figura 19 – Concentrações de glicose e xilose durante a sacarificação enzimática (A) e produção de etanol durante a fermentação (B), determinadas para os *slurries*; neutralizado, pré-suplementado, e destoxificado, em configuração híbrida e não híbrida.

Fonte: Arquivo pessoal

Conforme pode ser observado, os compostos solúveis presentes na fração líquida (Tabela 20), de fato, comprometeram a bioconversão; as estratégias de destoxificação com lacase, e de pré-suplementação com nutrientes, entretanto, contribuíram para o aumento do

rendimento da hidrólise enzimática (A) e/ou da fermentação subsequente (B), de diferentes maneiras.

Verificou-se que a pré-suplementação do *slurry* com nutrientes (3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte e 5 g/L de peptona) acarretou na maior liberação de glicose após 72h de sacarificação (alcançando 25 g/L), seguida pela destoxificação com lacase (23 g/L) e pela neutralização com NaOH (18,8 g/L).

No que concerne a fermentação dos *slurries* sacarificados, a Figura 19 também mostra que, apesar de melhorar a hidrólise enzimática, a estratégia de pré-suplementação não se mostrou benéfica à fermentação subsequente, sendo observada produção máxima de etanol semelhante àquela observada na fermentação do *slurry* apenas neutralizado. A destoxificação com lacase, por sua vez, levou às máximas produções de etanol (13,7 g/L na configuração não-híbrida, e 13,1 g/L na configuração híbrida); os tempos necessários para alcançar as máximas produções, entretanto, foram diferentes (48 e 72h, respectivamente).

A utilização de pré-suplementação, como estratégia alternativa para aprimorar a etapa de hidrólise enzimática, foi proposta por Tengborg et al. (2011). Estes autores observaram que a adição de nutrientes à mistura reacional previamente à hidrólise enzimática de abeto pré-tratado com SO₂ e lavado melhorou o rendimento de sacarificação da glucana (77,5%), em relação ao experimento controle, sem adição de nutrientes (73,0%). O efeito benéfico foi atribuído à diminuição da adsorção improdutiva de enzimas à lignina.

A estratégia de destoxificação com lacase, por sua vez, quando aplicada à conversão de *slurry* de palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor, provocou efeito negativo na hidrólise enzimática da glucana. Embora tenha resultado em melhora na fermentação subsequente, não levou a uma maior produção de etanol, devido à menor eficiência de sacarificação (MORENO et al., 2013a).

4.3.3.1. Eficiência de produção de etanol: SHCF

A Tabela 24 apresenta as eficiências e tempos de conversão dos *slurries integrais*; neutralizado, pré-suplementado, e destoxificado, híbrido e não híbrido.

Tabela 24 – Eficiências e tempos de conversão dos açúcares do bagaço de cana em etanol (SHCF)

Configuração	Tempo (h)	Eficiência* (%)
SHCF / <i>Slurry</i> neutralizado	120	30,8
SHCF / <i>Slurry</i> pré-suplementado	120	30,8
SHCF / <i>Slurry</i> destoxificado (não híbrido)	120	38,7
SHCF / <i>Slurry</i> destoxificado (híbrido)	96	38,9

*com base na conversão teórica dos açúcares contidos no bagaço de cana in natura em etanol

De acordo com os dados, o uso de *slurry* integral na produção de etanol, de fato, contribuiu para o aumento da eficiência de conversão, em relação à configuração onde há separação sólido-líquido (Tabela 23). Este comportamento corrobora com os resultados reportados por Jung et al. (2013), em que os autores demonstraram que a conversão de *slurries* leva a eficiências de conversão mais altas em relação à conversão de frações separadas. Isto porque, o uso de *slurry* permite o aproveitamento integral dos açúcares disponíveis, e, conseqüentemente, favorece a eficiência de conversão.

Apesar do exposto, os *slurries* provenientes de pré-tratamentos termoquímicos contém compostos que interferem nas etapas de bioconversão, e o emprego de métodos de destoxificação é necessário para melhorar a eficiência de conversão.

Conforme pode ser observado na Tabela 24, as eficiências de conversão do *slurry* destoxificado com lacase, em configuração híbrida e não-híbrida, foram semelhantes, 38,7 e 38,9%, respectivamente; mas superiores às eficiências de conversão determinadas para os *slurries* apenas neutralizado (30,8%) ou suplementado previamente à hidrólise enzimática (30,8%). Tendo em vista que o tempo necessário para a conversão (hidrólise + fermentação), ao lado da eficiência de conversão, é uma variável de extrema importância, a condução da conversão em modo híbrido, com pré-sacarificação e sem inativação de enzimas, permitiu a redução do tempo de conversão em 24h.

A estratégia de pré-sacarificação do material, mesmo que por períodos de tempo limitados, permite amenizar o efeito da incompatibilidade nas condições adequadas de hidrólise enzimática e fermentação. Shen et al. (2011), por exemplo, observaram que a pré-sacarificação (24 h de hidrólise + 48 h de SSF) do *slurry* (*cotton gin waste* e *recycled paper sludge*) levou ao aumento do rendimento de conversão (78,5%) em relação à conversão em modo SSF (69,8%).

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Com relação à composição química, distribuição granulométrica e condicionamento do bagaço de cana:

- verificou-se que o método empregado para a determinação da análise composicional se mostrou adequado em face dos resultados esperados;

- verificou-se que as composições químicas da fração sem finos e da fração contendo apenas finos são diferentes, sendo que a fração de finos possui altos teores de extrativos em água e cinzas, e baixo teor de lignina insolúvel em meio ácido;

- verificou-se que o material apresentou granulometria heterogênea, e que a estratégia de moagem em moinho de martelo levou à diminuição e homogeneização do tamanho de partículas;

Sugere-se, em trabalhos futuros, empreender esforços para a caracterização dos extratos aquosos e alcoólicos obtidos a partir das frações sem finos e contendo apenas finos, quanto à capacidade tamponante, teores de sólidos totais e cinzas, e identidade dos constituintes.

Com relação ao pré-tratamento do bagaço de cana:

- verificou-se que as três condições de pré-tratamento promoveram a completa remoção da hemicelulose, e que o aumento da severidade do pré-tratamento acarretou em aumento da eficiência de sacarificação dos sólidos pré-tratados, porém em menor recuperação de glicose;

- verificou-se que o pré-tratamento acarretou em alteração da morfologia, da porosidade e do índice de cristalinidade dos sólidos pré-tratados;

- verificou-se que a lavagem da fração sólida, após o pré-tratamento, gerou uma fração líquida contendo baixas concentrações de açúcares, havendo a necessidade de sua concentração para o aproveitamento na produção de etanol;

- verificou-se que o aumento da severidade de pré-tratamento acarretou na degradação dos açúcares presentes nos hidrolisados hemicelulósicos, elevando a concentração de inibidores e prejudicando a fermentabilidade dos mesmos;

- verificou-se que a diminuição da severidade do pré-tratamento acarretou em aumento da recuperação de polissacarídeos após o pré-tratamento, e da recuperação de açúcares monoméricos após a hidrólise enzimática.

Sugere-se, em trabalhos futuros, empreender esforços para diminuir a severidade do pré-tratamento, particularmente no que concerne a redução do tempo de aquecimento do reator e da concentração de ácido, a fim de aumentar o rendimento de recuperação de açúcares monoméricos e diminuir os custos desta operação.

Com relação à configuração “fermentação do hidrolisado hemicelulósico, em separado da sacarificação do sólido pré-tratado e da fermentação do hidrolisado celulósico, separadas (SHF)”:

- verificou-se que a fermentação do hidrolisado hemicelulósico foi comprometida pela presença de compostos inibidores presentes no meio, e que a destoxificação com lacase contribuiu para a melhoria da produção de etanol, principalmente no que concerne o tempo de conversão;

- verificou-se que a hidrólise enzimática do sólido pré-tratado foi prejudicada pela presença de compostos solúveis impregnados no material, e que o condicionamento com lacase, quando conduzido na presença destes compostos (sólidos não lavados), não influenciou a eficiência de sacarificação;

A eficiência máxima de conversão em configuração de SHF + FHH foi de 28,4%, devido a não lavagem do sólido pré-tratado (13,7%) e destoxificação do HH (14,7%).

Sugere-se, em trabalhos futuros, empreender esforços para melhorar a eficiência de separação entre sólidos e líquidos, após as etapas de pré-tratamento e sacarificação.

Com relação à configuração “sacarificação do sólido pré-tratado, em separado da co-fermentação dos hidrolisados celulósico e hemicelulósico, integradas (ISHCF)”:

- verificou-se que o uso de *slurry* integral aumentou a eficiência de conversão dos açúcares disponíveis em etanol, e que a destoxificação com lacase, previamente à sacarificação, apresentou efeito benéfico na conversão;

- verificou-se que a estratégia de pré-suplementação do *slurry*, previamente à hidrólise enzimática, favoreceu a sacarificação da glucana, mas não a conversão de glicose e xilose em etanol;

- verificou-se que a condução da conversão em modo híbrido, com pré-sacarificação e sem inativação de enzimas, diminuiu em 24h o tempo de conversão, sem prejudicar a eficiência de conversão dos açúcares disponíveis em etanol.

- A eficiência máxima de conversão em configuração de ISHCF foi de 38,9%, devido a destoxificação do *slurry* com lacase, associado a um menor tempo de conversão na configuração híbrida.

Sugere-se, em trabalhos futuros, empreender esforços para avaliar configurações alternativas de processo que permitam conversões eficientes e rápidas, tanto de glicose quanto de xilose, em etanol; idealmente, que permitam, também, o reciclo de células.

REFERÊNCIAS

- AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELYY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v.30, p.1515-1524, 2008.
- AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELYY, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K.S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2333-2336, 2006.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Biotechnology**, v.101, p.4851-4861, 2010.
- ALFANI, F.; GALLIFUOCO, A.; SAPOROSI, A.; CANTARELLA, M. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.184-192, 2000.
- ALRIKSSON, B; SJODE, A.; NILVEBRANT, N.O.; JONSSON, L.J. Optimal conditions for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 599-611, 2006.
- ALRIKSSON, B.; CAVKA, A.; JÖNSSON, L.J. Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocelluloses through chemical in-situ detoxification with reducing agents. **Bioresource Technology**, v.102, p.1254–1263, 2011.
- ANDRIC, P.; MEYER, A.S.; JENSEN, P.A.; DAM-JOHANSEN, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 308-324, 2010.
- ARESKOGH, D.; LI, J.; NOUSIAINEN, P.; GELLESSTEDT, G.; SIPILA, J.; HENROKSSON, G. Oxidative polymerization of models for phenolic lignin end-groups by laccase. **Holzforschung**, v. 64, p. 21-34, 2010.
- BALLESTEROS, L.; BALESTEROS, M.; CABAÑAS, A.; CARRASCO, L.; MÁRTIN, C.; NEGRO, M.J.; SAEZ, F.; SAEZ, R. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28-29, p. 307-315, 1991.
- BALLESTEROS, M.; OLIVA, J.M.; NEGRO, M.J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, v.39, p. 1843-1848, 2004.

BELLIDO, C.; BOLADO, S.; COCA, M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCIA-CUBERO, M.T. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v.102, p. 10868-10874, 2011.

BICHO, P.A.; RUNNALS, P.L.; CUNNINGHAM, D.; LEE, H. Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 50-54, 1988.

BOWER, S.; WICKRAMASINGHE, R.; NAGLE, N.J.; SCHELL, D.J. Modeling sucrose hydrolysis in dilute sulfuric acid solutions at pretreatment conditions for lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 7354-7362, 2008.

BROWNING, B.L. **Methods of wood chemistry**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1967. p.882.

CANILHA, I.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 92, p. 161-184, 2010.

CANILHA, L.; SANTOS, V.T.O.; ROCHA, G.J.M.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. Doi 10.1007/s10295-010-0931-2, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2011.

CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A.; SPERA, A.; ALFANI, F. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for bioproduction of ethanol in SHF and SSF. **Process Biochemistry**, v. 93, p. 1533-1542, 2004.

CARA, C.; RUIZ, E.; OLIVA, J.M.; SÁEZ, F.; CASTRO, E. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v.99, p. 1869-1876, 2008.

CARRASCO, C.; BAUDEL, H.; PEÑARRIETA, M.; SOLANO, C.; TEJEDA, L.; ROSLANDER, C.; GALBE, M.; LIDÉN, G. Steam pretreatment and fermentation of the straw material *Paja Brava* using simultaneous saccharification and co-fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.111, p. 167-174, 2011.

CARRASCO, C.; BAUDEL, H.; ROSLANDER, C.; GALBE, M.; LIDÉN, G. Fermentation of the straw material *Paja Brava* by the yeast *Pichia stipitis* in a simultaneous saccharification and fermentation process. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, v.3, p.99-106, 2013.

CARVALHO, W.; BATISTA, A.M.; CANILHA, L.; SANTOS, J.S.; CONVERTI, A.; SILVA, S.S. Sugarcane bagasse hydrolysis with phosphoric and sulfuric acids and hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.79, p.1308-1312, 2004.

CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.; CANILHA, L.; SILVA, S.S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate: metabolic behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v.25, p. 25-31, 2005.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, p. 2191-2195, 2009.

CAVKA, A.; ALRIKSSON, B.; AHNLUND, M.; JONSSON, L.J. Effect of sulfur oxyanions on lignocellulose-derived fermentation inhibitors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.108, p. 2592-2599, 2011.

CERQUEIRA-LEITE, R.C.; LEAL, M.R.L.V.; CORTEZ, A.B.; GRIFFIN, W.M.; SCANDIFFIO, M.I.G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, v. 34, p. 655-661, 2009.

CHANDEL, A.K.; KAPOOR, R.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1947-1950, 2007.

CHANDEL, A.K.; ANTUNES, F.A.F.; SILVA, M.B.; SILVA, S.S. Unraveling the structure of sugarcane bagasse after soaking in concentrated aqueous ammonia (SCAA) and ethanol production by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p.102, 2013.

CHUNG, S.K. Mechanism of sodium dithionite reduction of aldehydes and ketones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 46, p. 5457-5458, 1981.

D'ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: Celulose e papel: tecnologia de fabricação da pasta celulósica. São Paulo: IPT-SENA, 1988. v.1, cap. 3, p. 46-53; 68; 69; 76; 77; 95.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 220–225, 1996.

DEGENSTEIN, J.; KAMIREDDY, S.; TUCKER, M.P.; JI, Y. Novel batch reactor for dilute acid pretreatment of lignocellulosic feedstocks with improved heating and cooling kinetics. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 9, A95, 2011.

DÍAZ, M.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; MOYA, M.; CASTRO, E. Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysate from olive tree cuttings. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.891-899, 2009.

DONOHUE, B.S.; DECKER, S.R.; TUCKER, M.P.; HIMMEL, M.E.; VINZANT, T.B. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 101, p. 913-925, 2008.

DRIEMEIER, C.; OLIVEIRA, M.M.; MENDES, F.M.; GÓMEZ, E.O. Characterization of sugarcane bagasse powders. **Powder Technology**, v. 214, p. 111-116, 2011.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and paper chemistry and technology**. Berlin: Walter de Gruyter, 2009. 308p, v.1.

EKLUND, R.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 255-259, 1995.

ELANDER, R.T.; DALE, B.E.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M.R.; LEE, Y.Y.; MITCHINSON, C.; SADDLER, J.; WYMAN, C.E. Summary of findings from the Biomass Refining Consortium for Applied Fundamentals and Innovation (CAFI): corn stover pretreatment. **Cellulose**, v. 16, p. 649-659, 2009.

ERDEI, B.; FRNKÓ, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Separate hydrolysis and co-fermentation for improved xylose utilization in integrated ethanol production from wheat meal and wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5:12, 2012.

ESTEGHLALIAN, A.; HASHIMOTO, A.G.; FESKE, J.J.; PENNER, M.H. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass, **Bioresource Technology**, v. 59, p. 129-136, 1997.

ESTEVEES, P.J. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído em reator piloto aquecido por vapor direto**. 2011. 100p. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena/Universidade de São Paulo, Lorena, 2011

ESTEVEES, P.J.; CARVALHO, W. Cominuição do bagaço de cana-de-açúcar durante o pré-tratamento com H₂SO₄ diluído. In: SEMANA DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL 4, 07 de outubro, Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP), Lorena-SP, Brasil, 2013 (CD-ROM).

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**, Berlin: Walter de Gruyter, 1989. p. 67-68;106-108;133-134;139-141.

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

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J.J.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 78-88, 2006.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.S.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4775-4800, 2010.

GUPTA, R.; SHARMA, K.K.; KUHAR, R.C.; Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* NCIM 3498. **Bioresource Technology**, v.100, p.1214-1220, 2009.

HAMES, B.R.; THOMAS, S.R.; SLUITER, A.D.; ROTH, C.J.; TEMPLETON, D.W. Rapid biomass analysis, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 5-16, 2003.

HARRIS, J.F.; BAKER, A. J.; CONNER, A.H.; JEFFRIES, T.W.; MINOR, J.L.; PETTERSEN, R.C.; SCOTT, R.W.; SPRINGER E.L.; WEGNER, T.H.; ZERBE, J.I. Two-stage, dilute sulfuric acid hydrolysis of wood: an investigation of fundamentals. Local: Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory, 1985. 73 p. General Technical Report.

HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, R.A.; GONZÁLEZ-CÉZAR, PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A.; TREJO-ESTRADA. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1238-1245, 2009.

HINMAN, N.D.; SCHELL, D.J.; RILEY, C.J.; BERGERON, P.W.; WALTER, P.J. Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 34, p. 639–649, 1992.

HODGE, D.B.; KARIM, M.N.; SCHELL, D.J.; MCMILLAN, J.D. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. **Bioresource Technology**, v.99, p. 8940-8948, 2008.

HSU, T.C.; GUO, G. L.; CHEN, W. H.; WANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4907-4913, 2010.

HSU, T.A.; HIMMEL, M.; SCHELL, D.; FARMER, J.; BERGGREN, M. Design and initial operation of a high-solids, pilot-scale reactor for dilute-acid pretreatment of lignocellulosic biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57-58, 1996.

International Organization for Standardization. **ISO 13528**: Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. Genebra, Suíça, 2005.

ISHIZAWA, C.; DAVIS, M.F.; SCHELL, D.F.; JOHNSON, D.K. Porosity and its effects on the digestibility of dilute sulfuric acid pretreated corn stover. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2575-2581, 2007.

JEFFRIES, T.W. Emerging technology for fermenting D-xylose. **Trends in Biotechnology**, v.3, n.8, p. 208-212, 1985.

JEFFRIES, T.W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 320-326, 2006.

JEFFRIES, T.W.; KURTZAMAN, C.P. Strain selection, taxonomy, and genetics of xylose-fermenting yeasts. **Enzyme Microbial Technology**, v.16, p.922 -932, 1994.

JENNINGS, E.W.; SCHELL, D.J. Conditioning of dilute-acid pretreated corn stover hydrolysate liquor by treatment with lime or ammonium hydroxide to improve conversion of sugars to ethanol. **Bioresource Technology**, v.102, p.1240-1245, 2011.

JING, X.; ZHANG, X.; BAO, J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulose enzymes during cellulose hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.159, p.696-707, 2009.

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

JUNG, Y.H.; KIM, I.J.; KIM, H.K.; KIM, K.H Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 109-114, 2013.

JURADO, M.; PRIETRO, A.; MARTINEZ-ALCALÁ, A.; MARTÍNEZ, A.T.; MARTÍNEZ, M.J. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. **Bioresource Technology**, v.100, p.6378-6384, 2009.

KAI, Y. Chemistry of Extractives. In: HON D.N.S.; SHIRAISHI N. **Wood and cellulosic chemistry**. Nova York: Marcel Dekker, 1991. p. 215.

KIM, S.B.; LEE, Y.Y. Diffusion of sulfuric acid within lignocellulosic biomass particles and its impact on dilute-acid pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 165-171, 2002.

KUHAD, R.C.; GUPTA, R.; KHASAA, Y.P.; SINGHB, A.; ZHANG, Y.H.P. Bioethanol production from pentose sugars: current status and future prospects. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v.15, p.4950-4962, 2011.

KUMAR, R.; HU, F.; HUBBELL, C.A.; RAGAUSKAS, A.J.; WYMAN, C.E. Comparison of laboratory delignification methods, their selectivity, and impacts on physiochemical characteristics of cellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.130, p.372-381, 2013.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN- HÄGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N.O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p. 151–159, 1999.

LAVARACK, B.P.; GRIFFIN, G.J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 367-380, 2002.

LEWIN, M.; GOLDSTEIN, I.S. **Overview of the chemical composition of wood.** In: Wood structure and composition, Nova York: Marcel Dekker, 1991. p. 2-5.

LINDE, M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Steam pretreatment of acid-sprayed and acid-soaked barley straw for production of ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.129-132, p.546-562, 2006.

LLOYD, T.A.; WYMAN, C.E. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. **Bioresource Technology**, v.96, p.1967-1977, 2005.

LYND, L.; VAN ZYL, W.H; McBRIDE, J.E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.577-583, 2005.

MAZIERO, P.; JONG, J.; MENDES, F.M.; GONÇALVES, A.R.; EDER, M.; DRIEMEIER, C. Tissue-specific cell wall hydration in sugarcane stalks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p.5841–5847, 2013.

MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; ROMERO, I.; RUIZ, E.; CARA, C.; CASTRO, E. Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 175, p.185-191, 2011.

MILNE, T.A.; CHUM, H. L.; AGBLEVOR, O.; JOHNSON, D. K. Standardized analytical methods. **Biomass and Bioenergy**, v.2, p.341-366, 1992.

MOILANEN, U.; KELLOCK M.; GALKIN, S.; VIIKARI, L. The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 492-498, 2011.

MORENO, A.D.; IBARRA, D.; BALLESTEROS, I.; FERNÁNDEZ, J.L.; BALLESTEROS, M. Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* – Effects of steam pretreatment conditions, process configuration and substrate loadings. **Biochemical Engineering Journal**, v.79, p.94-103, 2013(b).

MORENO, A.D.; TOMÁS-PEJÓ, E.; IBARRA, D.; BALLESTEROS, M.; OLSSON, L. In situ laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies. **Bioresource Technology**, v.143, p.337-343, 2013 (a).

MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. Alternatives for detoxification of dilute-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v.93, p.1-10, 2004.

MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. Hydrolysate detoxification with charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p.1681-1684, 2001.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute acid hydrolysis of sugar cane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98, p.49-58, 2002.

NGUYEN, Q.A.; TUCKER, M.P.; KELLER, F.A.; EDDY, F.P. Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p.561-576, 2000.

NOGUEIRA, L.A.H. **Bioetanol de cana-de-açúcar**: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES e CGEE Organização, 2008. 316p.

ÖHGREN, K.; BENGTSSON, O.; GORWA-GRASLUND, M.F.; GALBE, M.; HAHN-HAGERDAL, B.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and fermentation of glucose and xylose with *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400. **Journal of Biotechnology**, v.126, p.488-498, 2006.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; LESNICKI, G.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. **Process Biochemistry**, v.42, p.834–839, 2007.

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

OLOFSSON, K.; RUDOLF, A.; LIDÉN, G. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v.134, p.112-120, 2008.

OLSSON, L.; HANH-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.312-331, 1996.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v.74, p.25-33, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.69-80, 2000

PENG, L.; CHEN, Y. Conversion of paper sludge to ethanol by separate hydrolysis and fermentation (SHF) using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p.1600-1606, 2011

PIETROBON, V.C.; MONTEIRO, R.T.R.; POMPEU, G.B.; BORGES, E.P.; LOPES, M.L.; AMORIM, H.V.; CRUZ, H.; VIÉGAS, E.K.D. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with acid or alkali. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, p.229-233, 2011.

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

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

ROMANI, A.; RUIZ, H.A.; PEREIRA, F.B.P.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Integrated approach for effective bioethanol production using whole slurry from autohydrolysed *Eucalyptus globulus* wood at high-solid loadings. **Fuel**, v.135, p.482-491, 2014.

RUDOLF, A.; BAUDEL, H.; ZACCHI, G.; HAHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. **Biotechnology and Bioengineering**, v.99, p.783-790, 2007.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v.40, p.3693-3700, 2005.

SANJUÁN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pith and fibers from mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und Werkstoff**, v.59, p. 447-450, 2001.

SANNIGRAHI, P.; KIM, D.H.K.; JUNG, S.; RAGAUSKAS, A. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. **Energy & Environmental Science**, v.4, p.1306-1310, 2011.

SANTOS, J.R.A.; LUCENA, M.S.; GUSMÃO, N.B.; GOUVEIS, E.R. Optimization of etanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1237 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v.26, p.584-588, 2012.

SANTOS, V.T.O.; ESTEVES, P.J.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. Characterization of commercial cellulases and their use in the saccharification of a sugarcane bagasse sample pretreated with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.38, p.1089-1098, 2011.

SARKS, C, JIN, M.; SATO, T.K.; BALAN, V.; DALE, B.D. Studying the rapid bioconversion of lignocellulosic sugars into ethanol using high cell density fermentations with cell recycle. **Biotechnology for Biofuels**, v.7, p.73-84, 2014.

SCHELL, D.J.; WALTER, P.J.; JOHNSON, D.K. Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover at high solids concentrations. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.34-35, p.659-665, 1992.

SCHELL, D.J.; FARMER, J.; NEWMAN, M.; MCMILLAN, J. D. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105, p.69-85, 2003.

SEABRA, J.E.A.; TAO, L.; CHUM, H.L.; MACEDO, I.C. A Techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic etanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. **Biomass and Bioenergy**, v.34, p.1065-1078, 2010.

SEGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN Jr, A.E.; CONRAD, C.M.; 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, 1959.

SELIG, M.J.; VIAMAJALA, S.; DECKER, S.R.; TUCKER, M.P.; HIMMEL, M.E.; VINZANT, T.B. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Progress**, v. 23, p.1333-1339, 2007.

SHEN, J.; SGBLEVOR, F.A. Ethanol production of semi-simultaneous saccharification and fermentation from mixture of cotton gin waste and recycled paper sludge. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 34, p. 33-43, 2011.

SHI, J.; EBRIK, M.A.; WYMAN, C.E. sugar yields from dilute sulfuric acid and sulfur dioxide pretreatments and subsequent enzymatic hydrolysis of switchgrass. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8930-8938, 2011.

SILVERSTEIN, R.A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R.R.; BOYETTE, M.D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3000–3011, 2007.

SIQUEIRA, G.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W.; KOCH, G.; FERRAZ, A. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 7-15, 2011.

SLUITER A.; HAMES B.; RUIZ R.; SCARLATA C.; SLUITER J.; TEMPLETON D.; CROCKER D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**, 2011. Technical report. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. Disponível em: www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf. Acesso em 08/04/2015

SÖDERSTROM, J.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Separate versus simultaneous saccharification and fermentation of two-step steam pretreated softwood for ethanol production. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 25, p. 187-202, 2007.

SÖDERSTRÖM, J.; PLICHER, L., GALBE, M.; ZACCHI, G. Two-step pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 24, p. 457-486, 2004.

SOUDHAM, V.; ALRIKSSON, B.; JONSSON, L.J. Reducing agents improve enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates in the presence of pretreatment liquid. **Journal of Biotechnology**, v. 155, p. 244-250, 2011.

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

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v.4, p.707-738, 2007.

TEMPLETON, D.W.; SCARLATA, C.J.; SLUITER, J.B.; WOLFRUM, E.J. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks (Method uncertainties). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9054-9062, 2010.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 835-844, 2001.

TOMÁS-PEJÓ, E.; OLIVA, J.M; BALLESTEROS, M.; OLSSON, L. Comparison of SHF and SSF process from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and

robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, p. 1122-1131, 2008.

WANG, G.S.; LEE, J.W.; ZHU, J.Y.; JEFFRIES, T.W. dilute acid pretreatment of corncob for efficient sugar production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.163, p. 658-668, 2011.

WEIERSTALL, T.; HOLLENBERG, C.P.; BOLES, E. Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. **Molecular Microbiology**, v. 31, p. 871-883, 1999.

WYMAN C.E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, p. 3-16, 1994.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISH, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 170-176, 2010.

ZHANG, M.; WANG, F.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 10, p. 4959-4964, 2010.

ZHAO, X.Q.; ZI, L.H.; BAI, F.W.; LIN, H.L.; HAO, X.M.; YUE, G.J.; HO, W.Y. Biotehanol from lignocellulosic biomass. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v.128, p. 25-51, 2012.

ZHENG, M.; XIMENES, E.; LADISCH, M.R.; MOSIER, N.S.; VERMERRIS, W.; HUANG, C.P.; SHERMAN, D.M. Tissue-specific biomass recalcitrant in corn stover pretreated with liquid hot-water: enzymatic hydrolysis (Part 1). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 390-397, 2011.

APÊNDICES

Apêndice A – Fluxograma que descreve o experimento de conversão do hidrolisado hemicelulósico não destoxificado e do sólido lavado não condicionado, separadamente, em etanol; com os respectivos tempos e eficiências de conversão

*EL – extrato de levedura; EM – extrato de malte; PEP - peptona

Fonte: Arquivo pessoal

Apêndice B – Fluxograma que descreve o experimento de conversão do hidrolisado hemicelulósico destoxificado com lacase (1 U/mL) e do sólido lavado não condicionado, separadamente, em etanol; com os respectivos tempos e eficiências de conversão

*EL – extrato de levedura; EM – extrato de malte; PEP - peptona

Fonte: Arquivo pessoal

Apêndice C – Fluxograma que descreve o experimento de conversão do hidrolisado hemicelulósico não destoxificado e do sólido não lavado e não condicionado, separadamente, em etanol; com os respectivos tempos e eficiências de conversão

*EL – extrato de levedura; EM – extrato de malte; PEP - peptona

Fonte: Arquivo pessoal

Apêndice D – Fluxograma que descreve o experimento de conversão do hidrolisado hemicelulósico destoxificado com lacase (1 U/mL) e do sólido não lavado e não condicionado, separadamente, em etanol; com os respectivos tempos e eficiências de conversão

*EL – extrato de levedura; EM – extrato de malte; PEP - peptona

Fonte: Arquivo pessoal

Apêndice E – Fluxograma que descreve o experimento de conversão do *slurry* integral neutralizado

*EL – extrato de levedura; EM – extrato de malte; PEP - peptona

Fonte: Arquivo pessoal

Apêndice F – Fluxograma que descreve o experimento de conversão do *slurry* integral suplementado (5 g/L peptona, 3 g/L extrato de levedura, 3 g/L extrato de malte) previamente a hidrólise enzimática

*EL – extrato de levedura; EM – extrato de malte; PEP - peptona

Fonte: Arquivo pessoal

Apêndice G -Fluxograma que descreve o experimento de conversão do *slurry* integral destoxificado com lacase (1 U/mL)

*EL – extrato de levedura; EM – extrato de malte; PEP - peptona

Fonte: Arquivo pessoal

Apêndice H – Fluxograma que descreve o experimento de conversão híbrida do *slurry* integral destoxificado com lacase (1 U/mL)

*EL – extrato de levedura; EM – extrato de malte; PEP - peptona

Fonte: Arquivo pessoal