UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena

Lucas Ramos

**Alternativas de hidrólise enzimática e fermentação em reatores de coluna
para aplicação em biorrefinarias integradas de primeira e segunda
geração empregando bagaço de cana-de-açúcar: dos experimentos em
laboratório à avaliação de viabilidade econômica**

Lorena
2019

LUCAS RAMOS

Alternativas de hidrólise enzimática e fermentação em reatores de coluna para aplicação em biorrefinarias integradas de primeira e segunda geração empregando bagaço de cana-de-açúcar: dos experimentos em laboratório à avaliação de viabilidade econômica

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

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar dos Santos

Versão Corrigida

Lorena

2019

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

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

Ramos, Lucas

Alternativas de hidrólise enzimática e fermentação em reatores de coluna para aplicação em biorrefinarias integradas de primeira e segunda geração empregando bagaço de cana-de-açúcar: dos experimentos em laboratório à avaliação de viabilidade econômica / Lucas Ramos; orientador Júlio César dos Santos - Versão Corrigida. - Lorena, 2019. 170 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. 2019

1. Etanol de segunda geração. 2. Hidrólise enzimática. 3. Reator de coluna. 4. Simulação de processos. 5. Análise econômica. I. Título. II. Santos, Júlio César dos, orient.

Dedicatória

*Ao meu filho Guilherme Amorim Ramos
pela presença alegre e carinhosa,
pelo amor que se permite dar e receber,
por ser a justificativa e inspiração
para todo e qualquer trabalho.
Lembrarei sempre das prosas,
da troca de experiência, de suas opiniões
e maneira de resolver os problemas.
Obrigado por acreditar e incentivar,
amo você Gui.*

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar ao senhor Deus pela vida, pela saúde e oportunidade de aprender diariamente.

À minha família que sempre incentivou a minha jornada e também ajudou nas tomadas de decisões ao longo do trabalho. Em especial ao meu Pai pela maturidade e incentivo.

Aos amigos Bruno Pardal, Davison, Ohana, Bruno Melo, Bruno Azevedo, Fábio, Felipe Vieira, Ruly, Marcelo, Luiz Fernando, Felipe Oliveira, Felipe, Otto, aos companheiros do laboratório LBBSIM e do laboratório do professor Sílvio.

A minha namorada Samira por ser uma excelente ouvinte e incentivar meu trabalho e por acompanhar toda essa trajetória.

Ao meu Orientador Júlio pelo exemplo de pessoa e disposição em ajudar em todos os momentos do trabalho.

À Universidade de São Paulo (USP), à Escola de Engenharia de Lorena (EEL), a todos o Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa do LNBR/CNPEM, Marcos Tássia, Isabelle, Fernanda Mendes.

A empresa Caldssteel Equipamentos LTDA.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Gostaria de agradecer o LNBR - Laboratório Nacional de Biorrenovaveis, CNPEM/MCTIC.

A FAPESP pelo auxílio financeiro desse projeto por estar vinculado aos projeto temático – Processos (#2014/06923-6 and #2015/10756-0).

RESUMO

RAMOS, L. **Alternativas de hidrólise enzimática e fermentação em reatores de coluna para aplicação em biorrefinarias integradas de primeira e segunda geração empregando bagaço de cana-de-açúcar: dos experimentos em laboratório à avaliação de viabilidade econômica.** 2019. 170p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Visando à viabilização da produção industrial do etanol de segunda geração, é fundamental o desenvolvimento de alternativas de processos e biorreatores susceptíveis de aplicação em larga escala. Neste contexto, propôs-se o uso de reatores de coluna para as etapas biológicas do processo de obtenção de etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino. Foram avaliadas configurações de fermentação/cofermentação em separado (SHF/SHCF) e simultâneas (SSF/SSCF). No processo SHF/SHCF, na etapa de hidrólise enzimática conduzida em reator de leito fixo, empregou-se planejamento de experimentos para determinar a influência de variáveis importantes. A realização da hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado em reator de coluna com vazão de recirculação da solução contendo enzimas de 22,7 mL/min e 12,5 % de carregamento inicial de sólidos no reator, resultou na hidrólise de 81% da glucana e 74% da xilana presentes no material. Experimentos adicionais empregando diferentes carregamentos de sólidos em frascos Erlenmeyer e no reator demonstraram que, na coluna com leito fixo, além da inibição por produto observada nos frascos, efeitos de limitação de transferência de massa resultaram na redução do rendimento de hidrólise da glucana em processo com elevados teores de sólidos. Na etapa de fermentação/cofermentação do hidrolisado obtido, foi avaliada a vazão de aeração no reator de coluna de bolhas (0,3-0,5vvm), sendo utilizadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* IR2 e *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124 para produção de etanol. O melhor desempenho de fermentação (fator de rendimento em produto, Y_p/s , de $0,40 \pm 0,02 \text{ gg}^{-1}$ e produtividade volumétrica, Q_p , de $1,58 \pm 0,04 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) e co-fermentação (Y_p/s de $0,31 \pm 0,01 \text{ gg}^{-1}$ e Q_p de $0,64 \pm 0,015 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) em batelada simples foi obtido utilizando a aeração de 0,5 vvm. Com esta aeração, foi realizado o reciclo de células para a condução das fermentações em bateladas repetidas, melhorando a performance no processo SHCF realizado com a levedura *S. stipitis*. No processo SSF/SSCF, as leveduras *S. cerevisiae* e *S. stipitis* foram aclimatizadas para condução do processo a 40° C em reator de coluna de bolhas utilizando 9 % de carregamento de sólidos com diferentes vazões de aeração (0,3-0,5 vvm). As máximas concentrações de etanol obtidas neste caso foram 18 g L^{-1} e 16 g L^{-1} , respectivamente, empregando as leveduras *S. cerevisiae* e *S. stipitis*, em 72h de processo com aeração de 0,5 vvm. Finalmente, o trabalho experimental realizado foi complementado com estudos de simulação e avaliação econômica de diferentes cenários de biorrefinarias integradas 1G2G de produção de etanol e eletricidade. As simulações, nas quais se empregaram dados de rendimento de hidrólise obtidos nos reatores de coluna nas etapas experimentais do trabalho, foram realizadas com auxílio do pacote computacional Aspen Plus® e forneceram informações para a avaliação econômica, na qual se utilizaram ferramentas da Biorrefinaria Virtual de Cana-de-açúcar (BVC). Foram avaliados diferentes cenários considerando diferentes teores de sólidos (9 e 14%) e tempos de hidrólise enzimática (8 e 24h), simulando-se processos considerando fermentação de glicose ou cofermentação de pentoses e hexoses. O menor custo do etanol 2G foi de R\$3,08 por litro de combustível, sendo observada para o cenário de fermentação de C6, hidrólise de 24 horas e 9 % de carregamento de sólidos no reator. A TIR (taxa interna de retorno) obtida para os cenários avaliados foi menor que a TMA (taxa mínima de atratividade) em todos os casos, indicando a necessidade de avaliação futura de alternativas como a inclusão de outros produtos na biorrefinaria, incluindo, por exemplo, os lignossulfonatos.

Palavras-chave: Etanol de segunda geração. Hidrólise enzimática. Reator de coluna. Simulação de processos. Análise econômica.

ABSTRACT

RAMOS, L. **Alternatives of enzymatic hydrolysis and fermentation in column reactors for application in first and second generation integrated using sugarcane bagasse: from experiments in the laboratory to the economic viability evaluation.** 2019. 170p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

The development of alternatives of processes and bioreactors that can be used in large scale is fundamental for viabilization of the industrial production of second generation ethanol. In this context, the use of column reactors was proposed for the biological steps of the process for production of 2G ethanol from sugarcane bagasse using alkaline sulfite pretreatment. Separate fermentation/cofermentation (SHF/ SHCF) and simultaneous fermentation/cofermentation (SSF/SSCF) configurations were evaluated. For the SHF/SHCF process, in the enzymatic hydrolysis step conducted in a flow-through packed bed reactor, design of experiments was used to determine the influence important variables. The enzymatic hydrolysis of pretreated bagasse in a column reactor with a flow rate of 22.7 mL/min for recirculation of the solution containing enzymes and 12.5% of initial solids loading resulted in the hydrolysis of 81% of the glucan and 74% of the xylan present in the material. Additional experiments were carried out using different solid loadings in Erlenmeyer flasks and in the reactor and showed that, in the fixed bed column, besides the product inhibition observed in flasks, effects of mass transfer limitation resulted in lower glucan hydrolysis yield in process with high solid content. In the step of fermentation/cofermentation of the obtained hydrolysate, the aeration rate in a bubble column reactor (0.3-0.5vvm) was evaluated, using the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* IR2 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124 for ethanol production. The best performance for fermentation ($Y_{p/s}$ yield factor, $0,40 \pm 0,02 \text{ gg}^{-1}$ and volumetric yield, Q_p , $1,58 \pm 0,04 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) and cofermentation ($Y_{p/s}$ of $0,31 \pm 0,01 \text{ gg}^{-1}$ and Q_p of $0,64 \pm 0,015 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) in single batch operation mode was obtained using 0.5 vvm of aeration. With this aeration, cells were recycled to conduct the fermentations in repeated batches, enhancing the performance of the SHCF process carried out using the yeast *S. stipitis*. In the SSF/SSCF process, the yeasts *S. cerevisiae* and *S. stipitis* were acclimatized for conduction of the process at 40 °C in a bubble column reactor using 9% of solids loading at different aeration rates (0.3 - 0.5 vvm). The highest concentrations of ethanol obtained were 18 g L^{-1} and 16 g L^{-1} , respectively, using yeasts *S. cerevisiae* and *S. stipitis*, in a 72-hour process with aeration of 0.5 vvm. Finally, the performed experimental work was complemented with studies of simulation and economic evaluation of different scenarios of 1G2G integrated biorefineries for ethanol and electricity production. In the simulations, experimental data of hydrolysis yield obtained in the column reactor in the experimental steps of the work were used. Simulations were performed aided by the software Aspen Plus® and generated information for the economic evaluation, which was carried out using tools of the Virtual Sugarcane Biorefinery (VSB). Different scenarios were evaluated considering different solids loading (9 and 14%) and enzymatic hydrolysis time (8 and 24h), simulating processes with fermentation of glucose or cofermentation of pentoses and hexoses. The lower 2G ethanol cost was R\$3,08, observed in the scenario with fermentation of C6, hydrolysis time of 24 hours and 9% of solids loading in the hydrolysis reactor. Internal Return Rate (IRR) values obtained for the evaluated scenarios were lower than Minimum acceptable rate of return MAAR in all cases, indicating the necessity of future evaluation of alternatives as the inclusion of other products in the biorefinery, as, for example, lignosulfonates.

Keywords: Second generation ethanol. Enzymatic hydrolysis. Column reactor. Simulation of processes. Economic assessment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar	30
Figura 2.2 - Representação da molécula de celulose (a) e das ligações de hidrogênio (b) intramoleculares (1) e intermoleculares (2)intermoleculares	31
Figura 2.3 - Representação esquemática da estrutura da arabinoxilana	32
Figura 2.4 - Representação da estrutura polifenólica da lignina	32
Figura 2.5 - Atuação conjunta das enzimas do complexo celulolítico	38
Figura 2.6 - Representação esquemática de reatores de coluna: (a) Reator de leito fixo, (b) reator de leito fluidizado.....	41
Figura 3.1 - Esquema simplificado (a) e fotografia do reator utilizado na hidrólise enzimática dos polissacarídeos de bagaço de cana-de-açúcar (reator de leito fixo) (b).	64
Figura 3.2 - Análise granulométrica do bagaço moído em moinho de martelo. Obs.: 1. Análise diferencial; 2. valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.....	70
Figura 3.3 - Valores preditos e observados para a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino. Os valores preditos foram calculados com base no modelo quadrático da Equação 8.....	78
Figura 3.4 - Superfície de resposta (a) e Curva de Nível (b) mostrando a influência da carga enzimática de celulase (FPU/g) e β -glicosidase (UI/g) na hidrólise da celulose.....	79
Figura 3.5 - Concentração de glicose (a) e xilose (b) em função do tempo de hidrólise enzimática em reator de coluna com leito fixo com diferentes carregamentos de sólidos e vazões de recirculação, conforme planejamento estatístico definido na Tabela 3.2 (para as replicatas no ponto central, apresentaram-se os valores de média $\pm$ desvio padrão)	80
Figura 3.6 - Gráfico de Pareto para o efeito das variáveis (linear e quadrático) A1 (razão mássica de sólido/líquido no reator) e A2 (vazão de recirculação), nas variáveis resposta (a) rendimento de hidrólise da celulose (%) ; (b) concentração de glicose (g L^{-1}), c) rendimento de hidrólise da hemicelulose (%) e (d) concentração de xilose (g L^{-1}), todas correspondentes a 24h de processo.	84
Figura 3.7 - Superfície de resposta (a) e Curva de Nível (b) mostrando a influência da razão de sólido:líquido (%) e vazão de recirculação (mL/min) na variável resposta concentração de xilose (g L^{-1}).	89

Figura 3.8 - Concentrações de açúcares no hidrolisado enzimático obtido usando diferentes teores de sólidos (a) em frascos de Erlenmeyer e (b) no reator de leito fixo. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão	92
Figura 3.9 - Concentração experimental de glicose (g / L) e curvas ajustadas pelos modelos de Cao e De La Cruz (—) e Chrastil (-----) para hidrólise enzimática realizada com diferentes carregamentos de sólidos em frascos Erlenmeyer (a, b, c) e (d, e, f) em biorreator de leito fixo de fluxo contínuo. Os carregamentos de sólidos utilizados foram de 2% (a), 5% (b), 7% (c), 9% (d), 12,5% (e) e 16% (f). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão	93
Figura 3.10 - Concentração de substrato e produto na fermentação de hidrolisado enzimático usando <i>S. cerevisiae</i> IR2 em diferentes aerações em reator de colunas de bolhas: (a) 0,3 vvm; (b) 0,5 vvm; (c) 0,7 vvm. Condições: 30 ° C, concentração inicial de células 20 g L ⁻¹	99
Figura 3.11 - Concentração de substrato e produto na cofermentação de hidrolisado enzimático usando <i>S. stipitis</i> em diferentes taxas de aeração em reator de colunas de bolhas: (a) 0,3 vvm; (b) 0,5 vvm; (c) 0,7 vvm. Condições: 30 ° C, concentração inicial de células 20 g L ⁻¹	102
Figura 3.12 - Concentração de glicose e etanol durante a fermentação com reciclo de células usando <i>S. cerevisiae</i> na aeração de 0,5 vvm no reator de coluna de bolhas	104
Figura 3.13 - Concentração de glicose, xilose e etanol durante a cofermentação com reciclo de células utilizando <i>S. stipitis</i> e aeração de 0,5 vvm em reator de coluna de bolhas.	106
 Figura 4.1 - Microrganismos após aclimatização progressiva (a) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aclimatizada (40°C), (b) <i>Scheffersomyces stipitis</i> aclimatizada (37°C) e (c) <i>Scheffersomyces stipitis</i> aclimatizada (40°C).....	121
Figura 4.2 - Perfil cinético de consumo de substratos e produção de etanol nas fermentações realizadas em frascos Erlenmeyer empregando a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (a) e <i>Scheffersomyces stipitis</i> (b) aclimatizadas. (—●—) Glicose; (—▲—) xilose; (—■—) etanol.	123
Figura 4.3 - Perfil cinético de consumo de substratos e produção de etanol nas fermentações realizadas em reatores de coluna empregando a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aclimatizada. (a) 0,3 vvm (b) 0,5 vvm e (c) 0,7 vvm. (—●—) Glicose; (—▲—) xilose; (—■—) etanol.....	124
Figura 4.4 - Perfil cinético de consumo de substratos e produção de etanol nas cofermentações realizadas em reatores de coluna empregando a levedura <i>Scheffersomyces</i>	

stipitis aclimatizada. (a) 0,3 vvm (b) 0,5 vvm e (c) 0,7 vvm. (—●—) Glicose; (—●—) xilose; (—●—) etanol..... 127

Figura 4.5 - Perfil cinético de consumo de substratos e produção de etanol nas fermentações realizadas em reatores de coluna empregando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* aclimatizada em processo SSSF em bateladas alimentadas por pulsos de bagaço. A vazão utilizada foi 3 vvm nas primeiras 24h e depois reduzida para 0,5 vvm. Resultados foram reportados para (—●—) Glicose; (—●—) xilose e (—●—) etanol. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ desvio padrão 130

Figura 5.1 - Fluxograma esquemático da produção de etanol 1G2G, processo em destilarias autônomas 1G (blocos brancos) e processo 2G (blocos cinza). A linha pontilhada representa os cenários C5 e C6 foram fermentadas separadas do caldo de cana..... 140

Figura 5.2 - Fluxograma geral simulado no programa Aspen Plus® representando o cenário de fermentação e as Hierarquias de processamento (a) e fluxograma de cofermentação da Hierarquia C5C6FERM, dentro da Hierarquia 2 G (b) 141

Figura 5.3 - Fluxograma de simulação da hierarquia 2G sintetizado no programa Aspen Plus® 142

Figura 5.4 - Fluxograma de processo (flowsheet) sintetizado na hierarquia 2G nos cenários propostos na hierarquia 2G..... 149

Figura 5.5 - Custos de investimento industrial total (1G2G) e por setores (1G e 2G) estimados para cada cenário avaliado com diferentes carregamentos de sólidos no biorreator de hidrólise enzimática e diferentes tempos de hidrólise 153

Figura 5.6 - Custo total de produção global de etanol (1G2G), do etanol de primeira geração (1G) e do etanol de segunda geração (2G). 159

Figura 5.7 - Distribuição dos custos de produção de etanol por área para cada cenário 1G e 1G2G para os cenários de cofermentação (a) e fermentação (b)..... 160

Figura 5.8 - Taxa interna de retorno (TIR) e valor presente líquido (VPL) para os diferentes cenários avaliados..... 162

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Matriz do planejamento composto central rotacional empregado para avaliação do efeito das variáveis carga de celulasas por grama de bagaço de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (FPU/g) e carga de β -glicosidase NS50012 (UI/g) no desempenho da hidrólise enzimática das frações carboidrato de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino (valores codificados entre parênteses).	63
Tabela 3.2 - Matriz do planejamento composto central rotacional empregado para avaliação do efeito das variáveis razão mássica sólido/líquido carregada no reator e vazão de recirculação no reator no desempenho da hidrólise enzimática das frações carboidrato de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino (valores codificados entre parênteses).....	65
Tabela 3.3 - Caracterização química do bagaço in natura (média $\pm$ desvio padrão).	71
Tabela 3.4 - Composição química percentual do bagaço in natura: dados da literatura.....	72
Tabela 3.5 - Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com solução de sulfito alcalino - Na ₂ SO ₃ 10% m/m e NaOH 5% m/m (resultados apresentados como média $\pm$ desvio padrão).	73
Tabela 3.6 - Atividade enzimática das preparações comerciais de enzimas utilizadas na reação de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino.	75
Tabela 3.7 - Digestibilidade enzimática de bagaço de cana-de-açúcar sob diferentes cargas de preparações comerciais de celulasas por massa de bagaço: reações conduzidas em frascos Erlenmeyer segundo um planejamento experimental 2 ² estrela rotacional. Tempo de reação: 24 horas.	76
Tabela 3.8 - Análise de variância para um modelo quadrático composto para o rendimento de hidrólise em função da carga de cada uma das preparações comerciais de enzimas utilizadas.	77
Tabela 3.9 - Digestibilidade enzimática de bagaço de cana-de-açúcar sob diferentes valores de razão mássica sólido/líquido e vazão de recirculação: reações conduzidas em reator de coluna segundo um planejamento experimental 2 ² estrela rotacional. Tempo de reação: 24 horas.	83
Tabela 3.10 - Análise de variância para um modelo quadrático composto para o rendimento de hidrólise da celulose em função da razão mássica sólido/líquido e vazão de recirculação.	85
Tabela 3.11 - Análise de variância para um modelo quadrático composto para a concentração de glicose em função da razão mássica sólido/líquido e vazão de recirculação.	86

Tabela 3.12 - Análise de variância para um modelo quadrático composto para o rendimento de hidrólise da hemicelulose em função da razão mássica sólido/líquido e vazão de recirculação	87
Tabela 3.13 - Análise de variância para um modelo quadrático composto para a concentração de xilose em função da razão mássica sólido/líquido e vazão de recirculação (o termo correspondente à interação A1, A2 foi excluído desta análise por apresentar baixa significância).	88
Tabela 3.14 - Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em diferentes teores de sólidos em frascos de Erlenmeyer e em reator de coluna de leito fixo (carga enzimática de 16,4 FPU/g de celulase e 4,38 U/g de β -glicosidase). Os resultados correspondem a 24 horas de hidrólise e são apresentados como valores médios e desvio-padrão de hidrólises em triplicata.....	91
Tabela 3.15 - Parâmetros obtidos utilizando os modelos Cao e De La Cruz e Chrastil para a hidrólise enzimática de glucana e da xilana em diferentes teores de sólidos iniciais em frascos Erlenmeyer e no reator de leito fixo preenchido com bagaço de cana pré-tratado.Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.	97
Tabela 3.16 - Parâmetros e resultados para fermentação e cofermentação realizados no reator de colunas de bolhas usando diferentes fluxos de aeração. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.	101
Tabela 3.17 - Resultados de bateladas repetidas de fermentação com reciclo de células realizado no reator de coluna de bolhas utilizando <i>S. cerevisiae</i> . Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.	104
Tabela 3.18 - Resultados de experimentos de cofermentação em bateladas repetidas com reciclo de células realizadas no reator de coluna de bolhas utilizando <i>S. stipitis</i> . Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.	106
Tabela 4.1 - Parâmetros e outros resultados relevantes obtidos na fermentação e cofermentação realizados no reator de colunas de bolhas usando diferentes fluxos de aeração. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.	128
Tabela 5.1 - Condições de cada um dos cenários propostos	142
Tabela 5.2 - Composição do bagaço de cana-de-açúcar e vazões mássicas adotadas.....	144
Tabela 5.3 - Premissas econômicas empregadas na análise dos cenários avaliados	148
Tabela 5.4 - Produtos das Biorrefinarias simuladas e percentual de bagaço excedente.....	151

Tabela 5.5 - Custo de investimento para cada etapa no processo de produção de etanol 1G e para cada cenário de cofermentação avaliado	155
Tabela 5.6 - Custo de investimento para cada etapa no processo de produção de etanol 1G e para cada cenário de fermentação avaliado.....	157
Tabela 5.7 - Investimentos estimados para cada etapa de produção de etanol 2G em cada cenário avaliado	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G	Etanol de primeira geração
1G2G	Biorrefinaria integrada primeira e segunda geração
2G	Etanol de segunda geração
BVC	Biorrefinaria virtual de cana-de-açúcar
C12	Sacarose
C5	Pentose
C6	Glicose
CAPEX	<i>Capital expenditure</i> (Custo de capital)
CBP	Bioprocesso Consolidado
EH	Hidrólise enzimática
L/TC	Litros de etanol por tonelada de cana
MESP	Mínimo preço de venda do etanol
NRTL	<i>Non-random two-liquid model</i>
OPEX	<i>Operational expenditure</i> (Custo operacional)
SHF	Hidrólise e fermentação em separado
SHCF	Hidrólise e cofermentação em separado
S/L	Sólido/Líquido
SSF	Hidrólise e fermentação simultânea
SSCF	Hidrólise e cofermentação simultânea
SSSF	Hidrólise e fermentação semissimultânea
TMA	Taxa mínima de atratividade
TIR	Taxa interna de retorno
VPL	Valor presente líquido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL E ESTRUTURA DA TESE	21
Referências	25
2 BIORREFINARIA INTEGRADA DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G: PRINCIPAIS ETAPAS ENVOLVIDAS E ANÁLISE DE VIABILIDADE ECONÔMICA.....	27
2.1 Introdução	28
2.2 Cana-de-açúcar e a utilização do bagaço como fonte energética	28
2.2.1 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar	29
2.2.2 Etanol de segunda geração	33
2.3 Pré-tratamento das matérias-primas lignocelulósicas.....	34
2.4 Biorreatores com elevados teores de sólidos para a hidrólise enzimática da celulose	36
2.4.1 Enzimas que atuam na hidrólise da celulose	36
2.4.2 Biorreatores com elevado teor de sólidos	39
2.5 Fermentação em diferentes configurações de processo.....	41
2.6 Simulação e avaliação de viabilidade econômica dos modelos de biorrefinaria	43
2.7 Conclusão	47
Referências	48
3 AVALIAÇÃO DE CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO/COFERMENTAÇÃO EM SEPARADO (SHF/SHCF) EM REATORES DE COLUNA	57
3.1 Introdução	58
3.2 Materiais e Métodos	60
3.2.1 Matéria-prima e caracterização	60
3.2.2 Pré-tratamento sulfito alcalino.....	60
3.2.3 Avaliação das condições de hidrólise em frascos Erlenmeyer	61
3.2.4 Avaliação das condições de hidrólise enzimática em reator de coluna com leito fixo ...	63
3.2.5 Modelagem matemática dos experimentos de hidrólise enzimática conduzidos em frascos Erlenmeyer e reatores de coluna	65
3.2.6 Fermentação e cofermentação	67
3.2.7 Métodos Analíticos.....	69
3.3 Resultado e Discussão	70
3.3.1 Granulometria e caracterização composicional do bagaço de cana-de-açúcar empregado nos experimentos	70
3.3.2 Pré-tratamento e caracterização química do bagaço pré-tratado	72

3.3.3 Hidrólise enzimática do material pré-tratado em frascos erlenmeyer.....	74
3.3.4 Hidrólise enzimática em coluna com leito fixo percolado.....	80
3.3.5 Modelagem matemática da hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado por sulfito alcalino em frascos erlenmeyer e em reator de leito fixo utilizando diferentes teores de sólidos	90
3.3.6 Fermentação e cofermentação em reator de coluna de bolhas	98
3.3.7 Fermentação e cofermentação com o reciclo de células	103
3.4 Conclusão.....	108
Referências.....	109
4 HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO/COFERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS (SSF/SSCF) EMPREGANDO LEVEDURAS ACLIMATIZADAS E BIORREATORES DE COLUNA.....	113
4.1 Introdução	114
4.2 Materiais e Métodos.....	116
4.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar.....	116
4.2.2 Pré-tratamento sulfito alcalino	116
4.2.3 Aclimatização dos microrganismos	117
4.2.4 Preparo do Inóculo	117
4.2.5 Avaliação de sistemas SSF e SSCF em frascos Erlenmeyer	118
4.2.6 Avaliação de sistemas SSF e SSCF em reator de coluna de bolhas	118
4.2.7 Processo de hidrólise e fermentação semissimultânea (SSSF) em batelada alimentada.....	118
4.2.8 Métodos analíticos	119
4.3 Resultado e Discussão.....	120
4.3.1 Aclimatização Progressiva dos microrganismos.....	120
4.3.2 Fermentação e Cofermentação em frascos Erlenmeyer	122
4.3.3 Fermentação e cofermentação em reatores de coluna.....	124
4.3.4 Fermentação semissimultânea em reator de coluna	129
4.4 Conclusão.....	131
Referências.....	131
5 SIMULAÇÃO E ANÁLISE DA VIABILIDADE ECONÔMICA DE UMA BIORREFINARIA INTEGRADA 1G2G DE PRODUÇÃO DE ETANOL E ELETRICIDADE EMPREGANDO PRÉ-TRATAMENTO SULFITO ALCALINO E BIORREATOR DE COLUNA PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	135
5.1 Introdução	136
5.2 Metodologia	139
5.2.1 Definição de Cenários.....	139

5.2.2 Síntese e simulação da biorrefinaria integrada 1G2G	143
5.2.3 Pré-tratamento sulfito alcalino e hidrólise enzimática	144
5.2.4 Avaliação de viabilidade econômica	146
5.3 Resultado e Discussão	148
5.3.1 Síntese da hierarquia 2G e integração na simulação 1G2G.....	148
5.3.2 Produção de etanol e eletricidade nos cenários avaliados	150
5.3.3 Análise da viabilidade econômica dos cenários propostos: custos.....	152
5.3.4 Taxa interna de retorno (TIR) e Valor presente líquido (VPL) para os diferentes cenários avaliados	161
5.4. Conclusão	163
Referências	164
6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	168
6.1 Conclusões Gerais	168
6.2 Recomendações para trabalho futuros	170

1 INTRODUÇÃO GERAL E ESTRUTURA DA TESE

A expansão acentuada e contínua do consumo mundial de energia, as perspectivas de esgotamento das reservas de petróleo em médio prazo, a instabilidade política de alguns países produtores de petróleo e a necessidade da redução das emissões de carbono responsáveis pelo aquecimento global, vêm estimulando o mercado mundial de biocombustíveis (BINOD et al., 2019; GAURAV et al., 2017). De fato, os biocombustíveis constituem uma das maiores prioridades de países emergentes como o Brasil, devido à importância e valorização crescente destes por razões ambientais, econômicas, sociais e estratégicas (PEREZ et al, 2014; UBAID RASOOL; HEMALATHA, 2016).

Pesquisas têm sido realizadas nas últimas décadas com o objetivo de viabilizar biorrefinarias para produzir compostos de interesse econômico e social a partir de materiais lignocelulósicos (BINOD et al., 2019; CASTRO; PEREIRA Jr. 2010; SILVA et al., 2010). A biomassa lignocelulósica apresenta potencial para uso como matéria-prima na geração de diversos produtos de interesse industrial dentro de um conceito integrado de biorrefinaria (GÍRIO et al., 2010).

No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar vem sendo estudado amplamente para a produção de etanol de segunda geração e outras biomoléculas. Atualmente, inclusive existem plantas industriais para produção de etanol de segunda geração instaladas no país, como a das empresas Raízen e Granbio (SANTOS et al., 2016). No entanto, estas plantas ainda não atingem suas capacidades instaladas, em especial pelas dificuldades encontradas em algumas etapas, entre as quais o pré-tratamento.

A produção nacional de cana-de-açúcar na safra 2018/2019 foi de 620,4 milhões de toneladas, correspondendo à geração de 174 milhões de toneladas de bagaço na safra (cerca de 28% da produção de cana processada, em massa úmida) (CONAB, 2019). Portanto, o bagaço é recurso abundante em países como o Brasil e a Índia, sendo composto de carboidratos (celulose e hemicelulose), lignina e outros componentes em menor proporção, como extrativos e compostos inorgânicos (AMAYA-DELGADO et al., 2018). A quantidade de cada constituinte varia de acordo com a região, clima, solo, maneira de armazenamento e outros fatores, variando de 39,5% a 45,7% para celulose, 25,6% a 29,6 para hemicelulose, 18,9% a 26,1% para lignina, 2,3% a 10,5% para extrativos e 1,1% a 6,0% para cinzas (ROCHA et al., 2015).

A lignina está ligada às frações de carboidratos, resultando em uma estrutura resistente à degradação biológica atuando como uma barreira à ação de enzimas sobre a

celulose. Desta forma, para o aproveitamento da glicose presente no bagaço na produção de etanol, as principais tecnologias em desenvolvimento incluem a hidrólise enzimática da celulose, mas requerem uma etapa prévia de pré-tratamento, cujo objetivo é tornar o material mais susceptível à ação das enzimas. Após a hidrólise enzimática, a glicose pode ser transformada em etanol por processo fermentativo empregando as leveduras tradicionalmente utilizadas no setor sucro-alcooleiro (AMAYA-DELGADO et al., 2018). Dependendo da alternativa tecnológica selecionada, a hemicelulose presente no bagaço pode ser hidrolisada na etapa de pré-tratamento, gerando uma mistura rica em xilose (MUSSATO et al., 2016). A hemicelulose pode também ser retida no material pré-tratado, sendo hidrolisada junto com a celulose na etapa enzimática, uma vez que os preparados enzimáticos comerciais possuem xilanases (GUILHERME et al., 2017). A xilose pode então ser convertida a etanol ou outros compostos de interesse empregando microrganismos específicos, favorecendo a viabilidade econômica da biorrefinaria (MENDES et al., 2018).

Com a finalidade de aumentar a digestibilidade enzimática do material lignocelulósico, existem diversos métodos de pré-tratamento (ácido, alcalino, organossolve, explosão a vapor, ultrassom, irradiação, cavitação hidrodinâmica, entre outros), permitindo modificar a composição ou estrutura do material, por exemplo, pela remoção de uma elevada fração de lignina e aumentando a área de exposição do substrato ao ataque enzimático. Neste trabalho, foi utilizado pré-tratamento sulfito alcalino, o qual é baseado em um processo termomecânico utilizado pela indústria papel e celulose (MENDES et al., 2015). Esse pré-tratamento possui vantagens quando utilizado no bagaço de cana-de-açúcar, favorecendo a hidrólise enzimática posterior em função da elevada remoção de lignina e adição de grupos sulfônicos na superfície do material, minimizando problemas de adsorção improdutiva de enzimas (SIQUEIRA et al., 2017). Em relação às etapas biológicas do processo (hidrólise enzimática e fermentação), a produção de etanol de segunda geração tem resultado no estudo de diferentes configurações possíveis. Há o estudo de processos de hidrólise e fermentação em separado (SHF – *Separate Saccharification and Fermentation*) ou em simultâneo (SSF – *Simultaneous Saccharification and Fermentation*), além de estudos de cofermentação de hexoses e pentoses em separado (SHCF – *Separate Saccharification and Co fermentation*) ou em simultâneo (SSCF – *Simultaneous Saccharification and Cofermentation*), até mesmo a proposta de processos consolidados (CBP – *Consolidated bioprocessing*), nos quais o mesmo microrganismo produz as enzimas hidrolíticas necessárias e fermenta o hidrolisado a etanol (BRETHAUER; WYMAN, 2009). Para viabilização em escala industrial, no entanto, o estudo destas etapas em reatores é fundamental. Neste caso, opções como reatores de coluna

são interessantes, pois são sistemas de construção e operação relativamente simples, possuindo vantagens como a possibilidade de uso de elevados teores de sólidos no processo (TÉRAN-HILLARES et al., 2016; TÉRAN-HILLARES et al., 2017).

Os benefícios do uso de diferentes alternativas de processo, no entanto, só podem ser devidamente analisados considerando-se o impacto no desempenho econômico do processo. Neste caso, no entanto, a precisão na estimativa das métricas de desempenho econômico depende dos balanços de massa e energia envolvidos no cenário de processo proposto. Para essa finalidade, ferramentas computacionais têm sido empregadas, incluindo pacotes de simulação como o Aspen Plus® (HEINZLE et al., 2006; MENDES et al., 2018). As simulações com auxílio do pacote computacional Aspen Plus® fornecem informações para a avaliação econômica, que foi realizada neste trabalho empregando ferramentas da Biorrefinaria Virtual de Cana-de-açúcar (BVC).

No presente projeto foi realizado trabalho experimental e de simulação de processos visando a uma melhor compreensão e avaliação de alternativas de processo em etapas fundamentais em biorrefinarias de segunda geração: hidrólise enzimática e fermentação. Para processos SHF e SHCF, o trabalho experimental de hidrólise enzimática e fermentação foi realizado, respectivamente, em reatores de coluna com leito fixo e reator de coluna de bolhas. Para as configurações SSF e SSCF, empregou-se um sistema de coluna de bolhas. Os processos de fermentação foram realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* IR2 e a cofermentação de pentoses e hexoses foi feita empregando a levedura *Scheffersomyces stipitis*. Os resultados obtidos possibilitaram a avaliação de condições de processo, compreensão da influência das variáveis envolvidas e o levantamento de dados necessários à etapa de simulação, na qual diferentes cenários foram simulados e avaliados comparativamente do ponto de vista de viabilidade econômica. Nestes cenários, consideraram-se biorrefinarias integradas de primeira e segunda geração, pois estas já foram demonstradas como vantajosas em relação à biorrefinarias “*stand-alone*”, ou seja, nas quais há apenas o processo de segunda geração (DIAS et al., 2013a).

O ineditismo do trabalho realizado incluiu a avaliação dos processos de hidrólise e fermentação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino em reatores de coluna de leito fixo e de bolhas com diferentes configurações de processos. A simulação e avaliação econômica empregando dados experimentais obtidos nestes reatores também se constituíram em uma proposta inovadora desenvolvida.

Neste contexto, o objetivo geral deste projeto foi contribuir no desenvolvimento de biorrefinarias de cana-de-açúcar, avaliando a viabilidade técnica e econômica, tanto com

trabalho experimental quanto em simulações auxiliadas por programas computacionais, de diferentes opções de biorreatores de coluna para hidrólise enzimática das frações carboidrato do material, além de diferentes configurações de processo, incluindo hidrólise e fermentação em separado e em simultâneo e a cofermentação de hexoses e pentoses. Nesse sentido teve como objetivos específicos:

1. Avaliação da hidrólise enzimática das frações carboidrato de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino, em reator de coluna com leito fixo, incluindo a determinação do efeito das variáveis razão sólido:líquido e vazão de recirculação no reator no desempenho do processo;
2. A avaliação da produção de etanol em reatores de coluna em processos SHF e SHCF, variando-se a aeração na etapa de fermentação;
3. Avaliação das configurações SSF e SSCF para a produção de etanol utilizando reator de coluna de bolhas;
4. Síntese e simulação, auxiliada pelo pacote computacional Aspen Plus®, de cenários alternativos de produção de etanol de segunda geração a partir de cana-de-açúcar, tendo por base as configurações de SHF e SHCF avaliadas anteriormente;
5. Avaliação, com auxílio das ferramentas da Biorrefinaria Virtual de Cana-de-açúcar (BVC), da viabilidade econômica de diferentes cenários de biorrefinarias integradas de primeira e segunda geração para produção de etanol 2G, sendo simulados os cenários de SHF e SHCF.

Para compreensão dos resultados do projeto, a tese foi estruturada em capítulos. Após este primeiro capítulo introdutório, seguiu-se uma revisão de literatura contextualizando o leitor com os assuntos estudados e discutidos ao longo do texto. No Capítulo 3, foram apresentados os resultados referentes aos processos de hidrólise e fermentação em separado e hidrólise e cofermentação em separado (SHF e SHCF) realizados em reatores de coluna. Nesse capítulo, na etapa de hidrólise enzimática empregou-se auxílio de modelos matemáticos para a interpretação e discussão dos resultados. No capítulo 4, foram apresentados os resultados de hidrólise e fermentação simultâneas e de hidrólise e cofermentação simultâneas (SSF e SSCF) realizadas no reator de coluna de bolhas. Tanto no Capítulo 3 quanto no capítulo 4 foi apresentado o perfil cinético dos processos de hidrólise e fermentação avaliados. No capítulo 5 apresentaram-se os resultados de simulação e avaliação econômica de cenários de fermentação e de cofermentação em separado, foi variado o teor de sólidos na hidrólise enzimática (9 e 14%) e o tempo de hidrólise (8 e 24 h) em biorrefinarias integradas 1G2G de cana-de-açúcar.

Referências

- AMAYA-DELGADO, L.; FLORES-COSÍO, G.; SANDOVAL-NUÑEZ, D.; ARELLANO-PLAZA, M.; ARRIZON, J.; GSCHAEGLER, A. Comparative of Lignocellulosic Ethanol Production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Intechopen-Special Topics in Renewable Energy Systems**, v.1 p.1-20, 2018.
- BINOD, P.; GNANSOUNOUB, E.; SINDHU, R., PANDEY, A.; Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v.5 p.317-325, 2019.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Jr. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. **Química Nova**, v. 33, n. 1 p. 181-188, 2010.
- CONAB, 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 04 jun. 2019.
- DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. (2013a). Evaluation of process configurations for second generation integrated with first generation bioethanol production from sugarcane. **Fuel Processing Technology**, 109, 84–89. doi:10.1016/j.fuproc.2012.09.041
- GAURAV, N.; SIVASANKARIB, S.; KIRANC, G, S.; NINAWEA, A.; SELVINB, J. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: a Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p.205-214, 2017.
- GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.
- GUILHERME, A. A.; DANTAS, P. V. F.; SOARES, J. C. J.; SANTOS, E. S.; FERNANDES, F. A. N. MACEDO; G. R. Pretreatments and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse aiming at the enhancement of the yield of glucose and xylose. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 37 n. 4, 2017.
- HEINZLE, E.; BIWER, A.; COONEY, C. Development of Sustainable Bioprocesses: modeling and assessment. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2006.
- MENDES, F. M.; HEIKKILÄ, E.; FONSECA, M. B.; MILAGRES, A. M. F. FERRAZ, A.; FARDIM, P. Topochemical characterization of sugar cane pretreated with alkaline sulfite, **Industrial Crops and Products** v.69, p. 60–67 2015.
- MENDES, F. M.; VASCONCELOS, M. H.; DIAS, M.O.S.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F.; SANTOS, J.C.; JESUS, C.D.F.; WATANABE, M.D.B.; JUNQUEIRA, T.L.; BONOMI, A. Alkaline sulfite pretreatment for integrated first and second generation ethanol production: A techno-economic assessment of sugarcane hybrids. **Biomass & Bioenergy**, v.119, 314-321, 2018.

MUSSATO, S. I. Biomass Pretreatment With Acids. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**, p. 169-185, 2016.

PEREZ, V. H.; SILVEIRA JR. E. G.; CUBIDES, D. C.; DAVID, G. F.; JUSTO, O. R.; CASTRO, M. A. P. P.; STHEL, M. S., DE CASTRO, H. F, Trends in Biodiesel Production: Present Status and Future Directions In: *Biofuels in Brazil*, 1 ed.: Springer International Publishing. 2014 v.1, p. 281-302.

ROCHA, G.J.M.; NASCIMENTO, V.M.; GONCALVES, A.R.; SILVA, V.F.N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physicalchemical composition. **Industrial Crops and Products**, 64, 52-58, 2015.

SANTOS, L. V.; DE BARROS GRASSI, M. C.; GALLARDO, J. C. M.; PIROLLA, R. A. S.; CALDERÓN, L. L.; DE CARVALHO-NETTO, O. V.; PEREIRA, G. A. G. Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. **Industrial Biotechnology**, v.12, p.40–57, 2016.

SILVA, V. S.; GARCIA, C. A.; SILVA, C. M. O. Destino do bagaço da cana-de-açúcar: um estudo a partir das agroindústrias sucroalcooleiras do Paraná. **Revistas em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 3, ed.1, p. 59-76, 2010.

SIQUEIRA, G.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnology Biofuels**, v.10, p. 1-12, 2017.

UBAID RASOOL, S.; HEMALATHA. A review on bioenergy and biofuels: sources and their production. **Brazilian Journal of Biological Sciences**, v. 3, n.5, p. 3-21, 2016.

TERÁN-HILARES, R.; RESÉNDIZ, A.L.; MARTÍNEZ, R.T.; SILVA S.S.; SANTOS, J.C. Successive pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane bagasse in a packed bed flow-through column reactor aiming to support biorefineries. **Bioresource technology**, v.203 p.42- 49, 2016.

TERÁN HILARES, R.; IENNY, Y. V.; MARCELINO, P.F.; AHMED, M.A.; ANTUNES, F.; DA SILVA, S.S.; DOS SANTOS, J.C. Ethanol production in a simultaneous saccharification and fermentation process with interconnected reactors employing hydrodynamic cavitation-pretreated sugarcane bagasse as raw material. **Bioresource Technology**, 243, 652-659, 2017.

2 BIORREFINARIA INTEGRADA DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G: PRINCIPAIS ETAPAS ENVOLVIDAS E ANÁLISE DE VIABILIDADE ECONÔMICA

RESUMO

Nos últimos anos, trabalhos de pesquisa científica têm sido desenvolvidos visando à produção de biocombustíveis devido ao aumento da concentração de CO₂, à poluição ambiental e ao esgotamento das fontes fósseis não renováveis. Nesse contexto, o etanol de segunda geração é uma opção promissora, sendo oriundo de fontes renováveis que estão amplamente disponíveis mundialmente. O aproveitamento de resíduos e/ou subprodutos em um país agroindustrial como o Brasil é uma alternativa ambientalmente amigável que traz benefícios econômicos e sociais, favorecendo o desenvolvimento de processos sustentáveis. Neste sentido, o beneficiamento integral da biomassa lignocelulósica auxilia no desenvolvimento de biorrefinarias e também em atender a demanda pelo combustível etanol. Neste capítulo, procedeu-se a uma breve revisão de literatura sobre as etapas de produção do etanol 2G, incluindo pré-tratamento, hidrólise enzimática e diversas configurações de fermentação e cofermentação. Discutiu-se também o uso pacote computacional Aspen Plus® em Biorrefinarias de cana-de-açúcar, incluindo informações de avaliação econômica empregando-se ferramentas da Biorrefinaria Virtual de Cana-de-açúcar (BVC). Inicialmente, foram apresentados aspectos importantes sobre os materiais lignocelulósicos, com ênfase no bagaço de cana-de-açúcar, seguindo-se uma abordagem sobre os processos utilizados em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar, destacando a importância do uso de reatores de colunas nessas etapas. Posteriormente, foi apresentada uma revisão sobre simulação de processos e análise econômica de uma biorrefinaria de primeira e segunda geração.

Palavras-chave: Etanol de segunda geração. Pré-tratamento sulfito alcalino. Reator de coluna. Simulação de processos. Análise econômica

2.1 Introdução

Nos últimos anos, as preocupações econômicas e ambientais com o uso de combustíveis fósseis têm aumentado e, com isso, há uma busca por fontes alternativas de energia, o que resulta em um desenvolvimento crescente de pesquisas no segmento de energia de fontes renováveis (BINOD et al., 2019; GAURAV et al., 2017).

Dentre as alternativas sustentáveis, tem-se a utilização de biomassa, ou seja, material de origem animal ou vegetal. Este material é capaz de fornecer combustível na forma sólida, líquida ou gasosa, e sua utilização, nas últimas décadas, é um indicativo de desenvolvimento socioeconômico de países industrializados (RUFFATO-FERREIRA et al., 2017).

A utilização de biocombustíveis traz inúmeros benefícios para o país como a redução de emissões poluentes em relação aos combustíveis fósseis e o desenvolvimento da atividade agrícola, além da redução da dependência de combustíveis fósseis importados (DIAS et al., 2015; LAGO et al., 2012).

Maior país tropical do mundo, o Brasil se destaca entre as economias industrializadas na utilização de fontes renováveis em sua matriz energética, e sua característica climática é uma vantagem, pois favorece o cultivo de materiais que se tornam biomassas de alto potencial para obtenção de energia (BINOD et al., 2019; RUFFATO-FERREIRA et al., 2017).

Dentre as diversas alternativas de biomassa, as matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza, compreendendo, majoritariamente, materiais agroindustriais, resíduos urbanos e madeiras de angiospermas e gimnospermas. Dentre os materiais lignocelulósicos gerados como subproduto agroindustrial, o bagaço de cana-de-açúcar é o mais abundante no Brasil (ÁVILA et al., 2018; CASTRO; PEREIRA Jr., 2010; OWUSU; ASUMADU-SARKODIE, 2016).

2.2 Cana-de-açúcar e a utilização do bagaço como fonte energética

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) foi cultivada pela primeira vez no Sudeste Asiático e Oeste da Índia, sendo atualmente majoritariamente produzida no Brasil (HOFSETZ e SILVA, 2012). De acordo com a CONAB (2019), a safra 2018/2019 foi de 620,4 milhões de toneladas, correspondendo à produção de 174 milhões de toneladas de bagaço na safra, cerca de 28% da produção de cana processada (massa úmida) (CONAB, 2019). A previsão

para a safra 2019/2020 é de 688,6 milhões de tonelada de cana, que corresponde a 192,8 milhões de tonelada de bagaço, ou seja, um incremento de 11% em relação à safra anterior.

A cana-de-açúcar, uma das mais importantes monoculturas agrícolas no Brasil, é uma gramínea pertencente ao grupo das monocotiledôneas. O bagaço, por sua vez, é um material fibroso obtido após a extração do caldo de cana-de-açúcar por esmagamento em moinhos. Apresenta potencial para uso em diversas aplicações, sendo que atualmente é usado para geração de energia (CARDOSO, 2013). A maior parte deste material é queimado nas caldeiras das usinas na geração direta de energia e vapor, havendo, no entanto, esforços de pesquisa para aprimoramento do desenvolvimento de tecnologia para a utilização do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e outras biomoléculas de maior valor agregado.

Realmente, diante da quantidade de bagaço produzido no Brasil, a produção de etanol a partir desse subproduto agroindustrial torna-se uma oportunidade interessante, pois, em posse de tecnologias adequadas, esse material é passível de conversão em açúcares fermentescíveis, os quais podem ser transformados em etanol (SILVA, 2012; ROCHA et al., 2015). De fato, nas últimas décadas, tem-se investido muito em tecnologias para o aproveitamento total da cana-de-açúcar visando à utilização do bagaço na produção de etanol combustível. Com a redução do consumo energético nas usinas, o fim das queimadas e o início do recolhimento da palha, a produção de etanol por tonelada de cana processada poderá crescer em torno de 50% com uso do bagaço e palha da cana como matérias primas (KOHLHEPP, 2010).

2.2.1 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

A composição química do bagaço de cana-de-açúcar inclui principalmente as frações macromoleculares celulose (material em maior quantidade), hemicelulose e lignina (SILVA, 2012). A Figura 2.1 representa os principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar.

Como todo material lignocelulósico, o bagaço de cana-de-açúcar apresenta em sua composição uma matriz básica constituída de celulose, hemicelulose e lignina (ROCHA et al., 2015). A quantidade de cada constituinte varia de acordo com a região, com o clima, solo, armazenamento e outros fatores, variando de 39,5% a 45,7% para celulose, 25,6% a 29,6 para hemicelulose, 18,9% a 26,1% para lignina, 2,3% a 10,5% para extrativos e 1,1% a 6,0% para cinzas (ROCHA et al., 2015).

Figura 2.1 - Principais componentes do bagaço de cana-de-açúcar

Fonte: Adaptado de Rueda (2010).

A celulose é um homopolissacarídeo fibroso, resistente e insolúvel em água. Possui uma estrutura linear de unidades de D-glicose que estão ligadas por ligações glicosídicas β -1-4 (NELSON; COX, 2014), sendo o biopolímero mais abundante na natureza. Os grupos hidroxilas presentes na molécula permitem dois tipos de ligações de hidrogênio: interações intermoleculares (que ocorrem entre moléculas de cadeias adjacentes) e intramoleculares (que ocorrem entre moléculas de glicose adjacentes, dentro da mesma cadeia) (FENGEL, 1983; HABIBI et al., 2010).

Na Figura 2.2 estão ilustradas essas ligações de hidrogênio. As regiões com interações de hidrogênio intra e intermoleculares formam estruturas organizadas na celulose - regiões cristalinas; porém, a celulose não é uniforme, apresentando também regiões amorfas, com baixa organização (FENGEL, 1983).

Figura 2.2 - Representação da molécula de celulose (a) e das ligações de hidrogênio (b) intramoleculares (1) e intermoleculares (2) intermoleculares

a

b

Fonte: Adaptado de Castro e Pereira Jr. (2009).

As hemiceluloses estão associadas à celulose e à lignina e apresentam cadeias menores e ramificadas. Essa fração macromolecular é formada por um conjunto de polímeros compostos por diferentes unidades de hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) (FENGEL, 1983). Diferencia-se da celulose por sua estrutura totalmente amorfa e, portanto, menos resistente ao ataque de agentes químicos (HABIBI et al., 2010). A Figura 2.3 apresenta uma representação de uma estrutura de arabinoxilana, um dos principais componentes da hemicelulose da cana-de-açúcar.

A lignina é uma macromolécula polifenólica, sendo responsável pela coesão entre as fibras por se comportar como uma rede tridimensional insolúvel que garante a rigidez do material lignocelulósicos. Atua como uma barreira de proteção contra a ação microbiana devido a sua estrutura complexa e recalcitrante, formando, com as frações carboidrato do material, uma matriz que protege a planta de ataques químicos, enzimáticos e de microrganismos (FENGEL, 1983; NELSON; COX, 2014).

A estrutura compacta da lignina permite que esta macromolécula desempenhe papéis importantes para o desenvolvimento das plantas, como suporte mecânico, favorecimento do

transporte de água e nutrientes (característica hidrofóbica), defesa contra o ataque de microrganismos e fotodegradação. Apresenta muitas aplicações, não só como combustível para energia térmica, mas também como matéria-prima para a indústria química e farmacêutica, principalmente para a produção de resinas, polímeros, colas e cosméticos (NELSON; COX, 2014).

Figura 2.3 - Representação esquemática da estrutura da arabinoxilana

Fonte: Adaptado de Hatfield et al. (2017)

A Figura 2.4 apresenta a estrutura da lignina.

Figura 2.4 - Representação da estrutura polifenólica da lignina

Fonte: Fengel, 1983

2.2.2 Etanol de segunda geração

O Programa do álcool Brasileiro (PROÁLCOOL) foi lançado no ano de 1975 com o objetivo de reduzir a dependência de combustíveis fósseis importados durante a crise mundial do petróleo (HOFSETZ; SILVA, 2012).

Nos anos seguintes, a produção de etanol de primeira geração (1G), obtido a partir de sacaríneos e amiláceos, foi evoluindo mundialmente e hoje possui mercados comerciais maduros e tecnologias bem desenvolvidas. Brasil e Estados Unidos destacam-se nesse setor, sendo os principais produtores de etanol 1G, utilizando cana-de-açúcar e milho como matéria-prima, respectivamente (MAEDA, et al., 2013). O Brasil, apesar de utilizar a cana-de-açúcar como principal matéria-prima para a produção de etanol, tem aumentado sua produção utilizando também o milho como matéria-prima (BNDES, 2014; CEISE, 2019).

O etanol, além de resultar em uma combustão mais limpa, apresentando uma vantagem ecológica em relação à gasolina, possui maior resistência à auto-detonação e maior massa específica, o que proporciona maior potência ao motor (MORO, 2015). Considerando-se essas vantagens do etanol e o fato do Brasil ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, este álcool é hoje uma das principais fontes de energia do país (NOVA CANA, 2013).

O etanol 2G é produzido a partir de materiais lignocelulósicos e apresenta algumas vantagens em relação ao de primeira geração. Essas vantagens incluem elevada disponibilidade de matéria-prima, um maior potencial de redução na emissão de CO₂ quando se considera o balanço global de carbono (principalmente comparado ao uso do milho como matéria-prima) e o fato de sua obtenção não implicar na competição com a cadeia de produção de alimentos (DAYSTAR et al., 2015; GONZALEZ et al., 2012).

A produção do etanol 2G está em expansão e acredita-se que, em longo prazo, se tornará economicamente viável em grande escala. Atualmente, existem inclusive plantas industriais para produção de etanol de segunda geração instaladas no país, como a Raízen e Granbio (SANTOS et al., 2016). No entanto, estas plantas ainda não atingem suas capacidades instaladas, em especial pelas dificuldades encontradas em algumas etapas, entre as quais o pré-tratamento. Contudo, é necessário que haja melhoria no processo, considerando-se que o emprego dos materiais lignocelulósicos é mais complexo devido à recalcitrância que esses materiais apresentam e devido a sua estrutura recalcitrante, tornando necessárias etapas anteriores à fermentação e que permitam promover a separação de seus principais componentes para possibilitar aproveitamento de açúcares fermentescíveis (CHEN et al., 2017; HOFSETZ; SILVA, 2012).

Para produção do etanol 2G, o material lignocelulósico é submetido a etapas de pré-tratamento, hidrólise dos carboidratos e fermentação. A hidrólise da celulose produzirá glicose, que poderá ser convertida em etanol por leveduras tradicionalmente empregadas nos processos de produção de etanol 1G, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*. A hidrólise da fração hemicelulósica produzirá uma mistura de açúcares, sendo, no caso do bagaço de cana-de-açúcar, a xilose obtida em maior quantidade. Esta pode ser convertida em etanol por algumas leveduras com capacidade de fermentar pentoses tais como a *Scheffersomyces stipitis* e *Scheffersomyces shehatae* (OGATA, 2013), ou por microrganismos geneticamente modificados (YÁÑEZ-S et al., 2012).

2.3 Pré-tratamento das matérias-primas lignocelulósicas

Proceder diretamente à hidrólise da celulose é possível por métodos como tratamento ácido. Esta opção, no entanto, requer condições extremas de temperatura e pressão, o que encarece o processo e resulta em problemas como degradação do produto e formação acentuada de compostos inibidores do metabolismo microbiano, diminuindo ou até mesmo inviabilizando o processo fermentativo subsequente (AUXENFANS et al., 2012; SINDHU et al., 2016). Assim, esforços de pesquisa têm sido feitos para a viabilização de uma etapa de pré-tratamento do material, a qual pode ser feita em condições comparativamente menos severas e torna sua estrutura mais susceptível a uma hidrólise da celulose em condições brandas de pressão e temperatura por via enzimática (AGBOR et al., 2011; GALBE; ZACCHI, 2012).

De fato, o pré-tratamento é fundamental no beneficiamento da biomassa lignocelulósica, pois esta, independentemente do tipo ou origem, possui uma recalcitrância à ação das enzimas hidrolíticas, particularmente celulasas, as quais têm sido utilizadas para obtenção de carboidratos monoméricos a partir da celulose. De fato, a estrutura complexa e fechada da matriz lignocelulósica leva à necessidade de um processamento preliminar para diminuir o efeito das barreiras físicas e químicas que dificultam e, conseqüentemente, diminuem o rendimento da etapa subsequente de hidrólise enzimática (SILVA et al., 2011; MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015).

Para o caso da produção de etanol de segunda geração, a hidrólise dos componentes do material para a obtenção de solução rica em açúcares fermentescíveis é uma etapa limitante do processo. Nos últimos anos, diversos tipos de pré-tratamento foram desenvolvidos

visando-se a obter elevados valores de rendimento de hidrólise enzimática. O tipo de biomassa utilizada e a eficiência requerida são importantes na escolha do pré-tratamento, que poderá ser físico (como moagem e trituração), químico (ex.: reações em meio ácido ou alcalino), físico-químico (ex.: explosão a vapor) e biológico (como o uso de fungos que degradam os principais componentes da biomassa) (CHEN et al., 2017).

Cada tipo de pré-tratamento modificará a biomassa de forma diferente e, portanto, apresentará efeitos e rendimentos diversos (MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015), sendo também empregada a combinação desses pré-tratamentos para melhoria da etapa de hidrólise enzimática (CHEN et al., 2017; KUMAR et al., 2009).

A etapa de pré-tratamento ainda é um gargalo de processo. Um pré-tratamento eficaz é capaz de maximizar o ataque enzimático e minimizar a formação de inibidores fermentativos. Além disso, deve resultar em mínima perda de carboidratos, devendo ter um custo reduzido, com baixo consumo energético e possibilidade de recuperação da lignina; assim, diante desses fatores, destacam-se os pré-tratamentos químicos, que associam substâncias alcalinas ou ácidas à temperatura elevada (ZHU et al., 2017).

Com relação aos pré-tratamentos ácidos, estes promovem a hidrólise da hemicelulose a monossacarídeos como xilose, manose, glicose, entre outros. Esse pré-tratamento é também denominado de pré-hidrólise e, por hidrolisar a fração hemicelulósica, aumenta a acessibilidade enzimática à fração celulósica (TYAGY et al., 2019; CARDONA, 2010). Para a realização do pré-tratamento ácido em resíduos agrícolas, utiliza-se normalmente ácido sulfúrico diluído (WYMAN et al., 2005; MODENBACH; NOKES, 2012). A utilização de ácido diluído é mais vantajosa que a utilização de ácidos concentrados, pois, embora estes possam ser aplicados sob temperaturas mais baixas, há um alto custo operacional e de manutenção ocasionados pela corrosão de equipamentos (WYMAN et al., 2005). Porém, é importante ressaltar que o pré-tratamento com ácido diluído também apresenta desvantagens, como o elevado consumo energético e, como todo pré-tratamento ácido, resulta na degradação de açúcares em compostos como furfural e hidróxi-metil-furfural (HMF) e a degradação de compostos aromáticos da lignina, os quais podem ser carreados a etapas subsequentes, afetando o metabolismo microbiano e reduzindo a eficiência ou a produtividade de processos fermentativos (SAHA et al., 2005; ALVIRA et al., 2010).

O pré-tratamento utilizando soluções alcalinas, por sua vez, apresenta algumas vantagens, pois essas substâncias normalmente não causam corrosão como os ácidos e, portanto, não é necessário o uso de equipamentos especializados (MODENBACH; NOKES, 2012). Esses tratamentos são realizados, comumente, com soluções de NaOH, Ca(OH)_2 e

amônia, e podem aumentar de forma eficiente a digestibilidade enzimática da celulose (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). São operados sob ampla faixa de condições, com temperaturas variando de ambiente a 150°C (MODENBACH; NOKES, 2012, WU et al., 2011).

O tratamento sulfito alcalino promove maior quebra das ligações beta-O-aril (ligações predominantes na molécula de lignina) que o pré-tratamento alcalino; dessa maneira, ocorre uma maior despolimerização e conseqüentemente uma maior solubilização da lignina (MENDES et al., 2013). Este pré-tratamento é capaz de remover a lignina de uma enorme variedade de plantas. Além disso, há um aumento da área superficial do material pelo intumescimento das partículas, aumentando a acessibilidade dos carboidratos pelas enzimas e reduzindo o grau de polimerização e cristalinidade da fração celulósica (MODENBACH; NOKES, 2012). Com o pré-tratamento sulfito alcalino, espera-se um aumento do teor de grupos iônicos e a clivagem de algumas ligações inter-poliméricas, incluindo ligações lignina-carboidrato. Irá então ocorrer a sulfonação da molécula de lignina, o que ocasiona um aumento da retenção de água da fibra e melhora a dissolução desta fração polifenólica (MENDES et al., 2013). Assim, as principais vantagens deste método são a alta deslignificação e retenção de polissacarídeos, além da sulfonação parcial da lignina (MESQUITA et al., 2016; WANG et al., 2018). A presença de grupos carregados na superfície da lignina também pode reduzir adsorção improdutiva de celulasas na etapa de hidrólise enzimática, favorecendo o processo (ZHU et al., 2009; MENDES et al., 2013). Tavares et al. (2018) acrescentam que, em razão deste método de pré-tratamento ser praticado industrialmente no segmento de papel e celulose, maquinaria e equipamentos estão disponíveis em escala industrial no mercado, reduzindo barreiras tecnológicas para comercialização.

2.4 Biorreatores com elevados teores de sólidos para a hidrólise enzimática da celulose

2.4.1 Enzimas que atuam na hidrólise da celulose

O pré-tratamento da biomassa é seguido das etapas biológicas de sacarificação (hidrólise enzimática) e fermentação, que têm como finalidade quebrar a cadeia polissacarídica em açúcares fermentescíveis e transformá-los em etanol. A hidrólise enzimática da celulose é altamente específica e ocorre em condições mais suaves de

temperatura, pressão e pH, o que torna esse processo vantajoso em aspectos energéticos e ambientais (MOUTTA et al., 2014). Além disso, apresenta elevada produção de açúcar, mínima formação de produtos secundários e baixa corrosividade de equipamentos (MOSIER et al., 2005 SARKAR, et al. 2012).

A hidrólise da celulose requer um grupo de enzimas que atuam sinergicamente e resulta em um meio rico em glicose. As celulasas são produzidas por fungos e bactérias e podem ser classificadas de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico em três grandes grupos: endoglucanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglucanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (CASTRO; PEREIRA, 2010). Consequentemente, os substratos insolúveis celulósicos são convertidos em açúcares solúveis pela ação sinérgica dessas enzimas (BAGGA; SANDHU; SHARM, 1990). Sabe-se que, quando ocorre ação conjunta das enzimas, há um rendimento melhor que a soma dos rendimentos individuais (Figura 2.5), sendo conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulasas (LYND et al., 2002):

- ✓ Sinergia EnG-ExG: atuação das endoglucanases nas regiões amorfas e liberação dos terminais redutores e não redutores, nos quais atuarão as celobiohidrolases (CBH) do tipo I e do tipo II, respectivamente;
- ✓ Sinergia ExG-ExG: as CBHs I e CBHs II atuam simultaneamente nos terminais redutores e não redutores havendo a liberação de celobiose;
- ✓ Sinergia ExG-BG e EnG-BG: as celobio-hidrolases atuam liberando celobiose e oligossacarídeos, substrato da β -glucosidase que libera glicose.
- ✓ As endoglucanases atuam clivando a molécula de glicose internamente em posições aleatórias. Também são chamadas CMCase, sendo o nome sistemático 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase, conforme a IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology (CASTRO; PEREIRA JR., 2010). Estas enzimas catalisam principalmente a hidrólise da celulose amorfa e liberam moléculas de menor massa molar, resultando ainda em terminais redutores e não redutores nos quais as exoglucanases poderão atuar (AHAMED et al., 2017; OSTERGAARD; OLSEN, 2010, ZHANG; ZHANG, 2013). Zhang e Zhang (2013), citando outros autores, informam que a maioria das endoglucanases possui um sítio ativo em formato de fenda, o qual permite à enzima ligar-se e clivar a cadeia da celulose, liberando glicose, celodextrinas solúveis ou fragmentos insolúveis de celulose, embora haja endoglucanases que

possuam a habilidade de hidrolisar celulose cristalina e gerar produtos como celobiose e celodextrinas mais longas.

Figura 2.5 - Atuação conjunta das enzimas do complexo celulolítico

EG: endoglucanases; **CBH:** celobiohidrolases; **BG:** β-glucosidases;

CDH: celobiose desidrogenase; **GH61:** Glicosil hidrolases família 61

Fonte: Vanholme et al. (2013).

As exoglucanases atuam nas extremidades das moléculas da celulose microcristalina e apresentam dois grupos de enzimas: as glucanohidrolases e celobiohidrolases. O primeiro grupo, cujo nome sistemático é 1,4-β-D-glucana-glucano-hidrolases, ainda é pouco relatado, sendo capaz de liberar glicose diretamente da cadeia polimérica (CASTRO; PEREIRA Jr., 2010; CHEN, 2014). As celobiohidrolases, ou 1,4-β-D-glucana-celobio-hidrolases, podem ser classificadas em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores (R), e do tipo II (CBH II), a qual hidrolisa terminais não redutores (NR) (OSTERGAARD; OLSEN, 2010).

As β-glucosidases são enzimas que liberam glicose pela hidrólise da celobiose e oligossacarídeos solúveis. São inibidas por produtos, assim como as celobiohidrolases (CASTRO; PEREIRA JR., 2010; CHOUDHARY, SINGH e NAIN, 2016).

Há ainda um grupo de enzimas oxidantes, as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), uma classe de enzimas recentemente descobertas e que têm atraído atenção pela capacidade de oxidar polissacarídeos, atuando na hidrólise da celulose (VALADARES, 2013; HEMSWORTH, 2014).

O uso destas enzimas tem sido amplamente estudado, embora os relatos em biorreatores, fundamentais para sua aplicação em escala industrial, ainda são escassos.

2.4.2 Biorreatores com elevado teor de sólidos

Algumas opções de biorreatores têm sido relatadas tanto para a etapa de hidrólise enzimática quanto para a etapa de fermentação no processo de produção de etanol 2G, sendo que, entre as diversas variáveis que devem ser consideradas, o teor de sólidos carregado no sistema de hidrólise enzimática é uma das mais importantes. São numerosos os relatos na literatura utilizando reatores com baixo carregamento de sólidos ($\leq 5\%$ de sólidos, m / m). No entanto, considerando-se a necessidade de melhorar eficiência do processo, os efeitos de elevado carregamento de sólidos ($\geq 15\%$ de sólidos, m / m) em diferentes operações unitárias dentro do processo têm sido relatados nos últimos anos (MODENBACH; NOKES, 2012; BORREGA; SIXTA, 2015).

A hidrólise enzimática com elevado carregamento de sólidos é a chave para a ampliação de escala em processos de conversão bioquímica de lignocelulósicos, por favorecer a produção de etanol graças à elevada concentração de açúcares obtida no hidrolisado (DI RISIO et al., 2011). A principal vantagem do uso de elevados carregamentos de sólidos no reator é a maior eficiência do processo devido ao uso de sistemas reacionais de menor tamanho, resultando em menor custo de capital e redução no custo energético para aquecimento, resfriamento e outras operações (MODENBACH; NOKES, 2012). Além disso, deve ser considerada a situação específica da biorrefinaria de cana-de-açúcar, na qual o bagaço a ser usado para produção de etanol de segunda geração é também combustível para produção da energia necessária para o processo; sendo assim, elevados carregamentos de sólidos levam a menor consumo de energia e, conseqüentemente, a maiores quantidades de bagaço excedente disponível para hidrólise (DIAS et al., 2013a).

O leito fixo ou empacotado tem sido tradicionalmente usado para a maioria dos reatores catalíticos em larga escala, devido a sua alta eficiência, baixo custo, facilidade de construção, operação, ampliação de escala, controle automático e menor grau de força de cisalhamento (AL-ZUHAIR et al., 2011; DOU et al., 2018; FERNANDES, 2010; POPPE et al., 2015). Algumas desvantagens para estes sistemas, entretanto, podem ser citadas, como a facilidade de obstrução do leito, aparecimento de caminhos preferenciais e fluxos de calor e massa ineficientes (ZANIN; MORAES, 2004).

O leito empacotado, no qual o material sólido é mantido como um leito fixo, já foi relatado para pré-tratamento ácido da biomassa (ZHU et al., 2004); porém, há escassez de trabalhos neste sentido. Recentemente, por exemplo, o grupo do Laboratório de Biopolímeros, Biorreatores e Simulação de Processos (LBBSIM)/EEL-USP relatou o uso de reatores de coluna com leito fixo (*“packed bed flow-through column reactor”*) para o pré-tratamento e hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar visando à produção de etanol. Este relato foi publicado por Terán-Hilares et al. (2016), tendo os autores empregado 13,2% de sólidos no reator de hidrólise enzimática e observado que cerca de 30 g/L de glicose e 10 g/L de xilose foram liberados do material pré-tratado em cerca de 24h de processo de hidrólise enzimática. O potencial do sistema foi demonstrado, sendo que os autores reportaram um rendimento da hidrólise da celulose de cerca de 50% (calculado com base em glicose liberada) no material pré-tratado por processo alcalino, indicando que o processo não estava otimizado.

O uso de reator nos processos de hidrólise enzimática permite variar o modo de operação, podendo trabalhar em batelada, batelada alimentada e de modo contínuo. Existem trabalhos na literatura que relatam o processo de hidrólise enzimática operando continuamente ou semi-contínuo; para este caso, normalmente a enzima precisa ser adsorvida e posteriormente desorvida para seu reuso no processo (GURRAN; MENKHAUS, 2014). É comum encontrar trabalhos utilizando reatores de tanque agitado e reatores de membrana em processos de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos; a escolha do reator, o modo de operação e a dimensão do reator devem ser considerados nesse tipo de processo biotecnológico (PINO et al., 2018).

A Figura 2.6 apresenta o esquema de uma reator de leito fixo e reator de leito fluidizado. Outra opção que permite melhorar as características de mistura do sistema quando comparado ao leito fixo, evitando a formação de caminhos preferenciais, é o reator de leito fluidizado. Sob o aspecto hidrodinâmico, este biorreator é um intermediário entre a mistura completa do CSTR ideal e o reator tubular do leito fixo ideal (BALCÃO et al., 1996).

Figura 2.6 - Representação esquemática de reatores de coluna: (a) Reator de leito fixo, (b) reator de leito fluidizado.

Fonte: Próprio autor

Conforme se aumenta a velocidade ascendente do fluido reacional, atinge-se um ponto no qual a queda de pressão no leito torna-se equivalente ao peso deste por unidade de superfície, fazendo com que as partículas percam o contato entre si e movimentem-se de maneira semelhante a um líquido em ebulição (leito fluidizado). Acima desta velocidade, há expansão do leito até que se atinja um valor máximo (velocidade máxima de fluidização), acima do qual as partículas são arrastadas para fora do reator (ZANIN; MOARES, 2004).

Além do biorreator, deve-se levar em conta especificidades do processo de produção de etanol de segunda geração. Entre elas, deve-se considerar a possibilidade de integração da etapa de hidrólise enzimática e fermentação, havendo diversos estudos com alternativas distintas.

2.5 Fermentação em diferentes configurações de processo

Após a etapa de pré-tratamento, a hidrólise enzimática surge como fator determinante na eficiência da obtenção e posterior conversão dos açúcares fermentescíveis a etanol. Esta

etapa pode ser operada de forma isolada ou em conjunto com a fermentação, empregando-se diferentes configurações, visando a um maior rendimento em etanol (ASK et al., 2012).

Têm-se quatro principais configurações de processo para produzir etanol a partir de biomassa lignocelulósica: hidrólise e fermentação em separado (*Separate Hidrolysis and Fermentation* - SHF), sacarificação e fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and fermentation* - SSF), sacarificação e co-fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Co-fermentation* - SSCF) e bioprocesso consolidado (*Consolidated bioprocessing* - CBP) (VAN ZYL et al., 2011). Estudos recentes mostraram resultados variáveis de SHF e SSF em termos de rendimento em etanol, dependendo das condições operacionais, microrganismo e biomassa utilizada (ANTUNES et al., 2017; ZHAO et al., 2011). A configuração mais comum é a SHF, na qual o material lignocelulósico é submetido ao pré-tratamento e, posteriormente, a solução resultante, rica em glicose, é levada para outro tanque onde irá ocorrer a fermentação. Esta configuração possibilita a execução de cada processo em condições ótimas (hidrólise $T=50^{\circ}\text{C}$ e fermentação $T=30^{\circ}\text{C}$, por exemplo), além de favorecer o reciclo das células (ASK et al., 2012). Neste caso, caso seja feita a fermentação simultânea de hexoses e pentoses, propõe-se o uso da nomenclatura SHCF (*Separate Hidrolysis and Cofermentation*).

SSF e SSCF são configurações de processo nas quais a hidrólise enzimática e fermentação ocorrem simultaneamente no mesmo reator. Isto permite que os açúcares liberados a partir da hidrólise sejam consumidos rapidamente pelos microrganismos, minimizando a inibição das enzimas celulolíticas por produtos de hidrólise (VAN ZYL et al., 2011; ASK et al., 2012; SONG et al., 2019). De fato, a inibição da hidrólise enzimática por celobiose e glicose tem sido relatada e, assim, a conversão da glicose a etanol no mesmo processo impedirá o acúmulo destes açúcares, favorecendo a reação enzimática (SILVA; CHANDELL, 2014, SONG et al., 2019). SSF/SSCF apresentam vantagens sobre o processo SHF/SHCF por apresentar um menor tempo de processamento, sendo que as complexidades de processo são minimizadas e precisa-se de um menor investimento de capital (CHANDELL e SILVA 2014; SONG et al., 2019). Uma desvantagem destas configurações é que as condições para a hidrólise enzimática e fermentação geralmente são as mesmas, porém não são as condições ótimas para ambos os processos.

Mesmo com esta desvantagem, alguns bons resultados têm sido relatados na literatura. Ohgren et al. (2007), por exemplo, relataram um aumento do rendimento de etanol em 13% no processo SSF, comparado ao SHF, empregando palha de milho como matéria-prima. Em outro trabalho, Ojeda et al. (2011), na qual utiliza simulação de processos para a comparação

de configurações SHF, SSF e SSCF na produção de bioetanol. Estes autores utilizaram a simulação de processos para estudar o balanço de energia e proceder à análise de exergia dessas diferentes configurações de produção de etanol de segunda geração a partir de biomassa proveniente de pré-tratamento ácido e observaram que, dentre eles, o sistema SSCF foi o que apresentou melhores resultados.

Sacarificação e fermentação simultâneas podem ser vantajosas também quando se trata de cofermentação de glicose e xilose (SSCF) por microrganismos como *S. cerevisiae* recombinante, o que pode resultar em maior rendimento global do processo. Em um trabalho realizado com capim (*Pennisetum purpureum* Schumach) utilizando-se a configuração SSCF para produção de etanol, Yasuda et al. (2014) obtiveram 74% de rendimento teórico após 96h. Comparando-se o processo de SHF e SSCF, Jin et al. (2012) verificaram que na primeira configuração houve a produção de $0,13 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de etanol, enquanto que no processo SSCF a produção foi de $0,23 \text{ g/L.h}$, demonstrando assim que esse tipo de configuração pode resultar em maior produtividade.

Uma configuração alternativa que tem sido proposta é o CBP, no qual a produção de enzimas, a hidrólise e a fermentação são realizadas em um único tanque. Neste processo, uma comunidade de microrganismos é utilizada para produção de celulasas e para a fermentação (ASK et al., 2012). Nesta configuração todas as etapas de carácter biológico são realizadas simultaneamente, sendo, no entanto, difícil encontrar microrganismos capazes de executar com eficiência todas as etapas em conjunto (BRETHAUER; WYMAN, 2009; CHANDELL; SILVA, 2014; CHOUDHARY; SINGH; NAIN, 2016).

Diante dessas diversas configurações de processos para a produção de etanol de segunda geração, a utilização de ferramentas computacionais como a simulação de processos e análise de viabilidade econômica é de extrema relevância para determinar a melhor forma de produção do ponto de vista econômico e também ambiental, permitindo identificar pontos críticos e gargalos de processo.

2.6 Simulação e avaliação de viabilidade econômica dos modelos de biorrefinaria

Os estudos na área de desenho e simulação de um bioprocessos correspondem ao trabalho conceitual realizado antes da construção, expansão ou modernização da planta industrial. Este trabalho, quando realizado em laboratórios de pesquisa e desenvolvimento, possibilita investigar operações bioquímicas complexas e integradas em escala de produção industrial, sem a necessidade de extensiva experimentação, possuindo a vantagem de analisar

o processo como um todo e não apenas as operações unitárias (GOSLING, 2005; DIAS et al., 2013c). Dentre as vantagens da simulação incluem-se a previsão de resultados, estimativa de tempo de processo e conhecimento sobre relevância e interação de variáveis em um determinado processo.

Esta ferramenta favorece uma série de tarefas, como a criação de diagramas de fluxo do processo, a execução de balanços de massa e energia, a determinação do tamanho de equipamentos e a estimativa de custos, análise de impactos ambientais e viabilidade de um determinado projeto (GOSLING, 2005; BONOMI et al., 2016).

É relatado na literatura o uso de diversos simuladores de processos, como o Aspen Plus®, o EMSO (*Environment for Modeling, Simulation and Optimization*), SuperPro Designer®, relacionados a biorrefinarias empregando biomassa vegetal, incluindo cana-de-açúcar. Estes estudos incluem abordagens com processo de produção completa de primeira geração (1G), segunda geração (2G) e a biorrefinaria integrada das gerações (1G2G), como também o beneficiamento de subprodutos e inclusão de novas tecnologias e/ou processos em indústrias já em operação (BONOMI et al., 2016).

O Aspen plus é o simulador de processos mais utilizado, tanto em pesquisas industriais quanto em setores industriais, apresentando um pacote de propriedades termodinâmicas e métodos de estimativas que tem sido apontado como o mais completo em comparação a outros utilizados em biorefinarias. É um pacote computacional com um conjunto de programas para simulação dos fluxogramas de processos industriais, apoiado por bases de dados robustas, conjunto de módulos e simulação com ferramentas flexíveis (WEIFENG et al., 2006).

Para avaliação de cenários industriais de biorrefinarias, a Biorrefinaria Virtual de Cana-de-açúcar (BVC), desenvolvida no Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR/CNPEN/MCTI), é uma plataforma que permite avaliar a integração de novas tecnologias nas etapas agrícolas, industrial e de uso, à cadeia produtiva de cana-de-açúcar e outras biomassas, avaliando as estruturas econômica, ambiental e social. São diversas as tecnologias utilizadas pela BVC, estando incluída a produção de etanol 2G e as diferentes estratégias de comercialização e uso do etanol como biocombustível, além de outras (LNBR, 2011).

Tecnologias como a produção de etanol 2G por diferentes processos de hidrólise e pré-tratamento são o exemplo em evidência da utilização da BVC para simulação e a análise técnico-econômica no âmbito de biorrefinarias de cana-de-açúcar. A verificação da viabilidade de acoplamento de novos produtos à cadeia produtiva de cana-de-açúcar também

é um exemplo de aplicação (CARDOSO et al., 2013; DIAS et al., 2013a; DIAS et al., 2013b; MARIANO et al., 2013; RIVERA et al., 2014). Nesse contexto, a BVC se destaca como uma importante ferramenta para utilização pela comunidade científica e industrial.

São encontrados diversos trabalhos na literatura referentes à produção de etanol 2G considerando o aspecto econômico e o ambiental.

Dias et al. (2013a), por exemplo, avaliaram diferentes configurações do processo de produção de etanol de segunda geração integrado a usina de primeira geração em uma destilaria autônoma, incluindo o uso de elevado teor de sólidos na hidrólise, a realização de uma etapa de deslignificação alcalina e a fermentação ou biodigestão das pentoses. Os autores verificaram que ganhos no rendimento da hidrólise quando são utilizados baixos teores de sólidos no reator levam a um elevado consumo de energia, o que diminui a quantidade de bagaço disponível para uso como matéria-prima, consequentemente diminuindo a produção total de etanol no processo integrado apesar da produção específica de etanol por kg de material lignocelulósico ser maior.

Em outro trabalho, Dias et al. (2013b) estudaram a configuração do sistema de cogeração e seu impacto na produção de etanol de segunda geração em um processo integrado à primeira geração. Simulações foram feitas com auxílio do programa Aspen Plus® e diferentes configurações para sistema de cogeração e uso de pentoses (biodigestão e fermentação) foram comparadas. Esta comparação foi feita tendo por base a avaliação do processo do ponto de vista econômico e ambiental. A análise econômica baseada em dados obtidos junto ao setor produtivo e especialistas da área demonstrou que a produção de eletricidade acoplada à produção de etanol de segunda geração, mesmo que em pequena quantidade, melhora a rentabilidade do processo. Os resultados das simulações também demonstraram que a inclusão da fermentação das pentoses resulta em aumento na produção de etanol em 40-50% em relação ao processo de primeira geração. Entre as configurações analisadas, observou-se ainda que o uso de caldeiras de 65 bar reduziu o impacto ambiental na maioria das categorias consideradas.

Em um trabalho mais recente, Junqueira et al. (2017) analisaram, do ponto de vista econômico e ambiental, biorrefinarias de cana-de-açúcar em diferentes cenários – de curto, médio e longo prazo. Os autores estimaram os custos de produção de etanol nos diferentes cenários, mostrando que, em curto prazo, o custo de etanol 2G é mais elevado em comparação ao etanol 1G, mas que, em longo prazo, o desempenho econômico seria invertido, tornando-se o etanol 2G mais competitivo. Além disso, pela perspectiva ambiental, concluíram que tanto o

etanol 1G quanto o 2G puderam reduzir os impactos das mudanças climáticas em mais de 80% comparados ao da gasolina.

No trabalho de Mendes et al. (2018), utilizou-se o programa o Aspen Plus® e a plataforma BVC (BONOMI et al., 2016) para avaliar 32 cenários de biorrefinarias 1G2G a partir de 4 híbridos de cana-de-açúcar com composições distintas, incluindo diferentes condições de pré-tratamento sulfito alcalino, tempos de hidrólise enzimática e destino das pentoses. Ao fim, realizaram análise de sensibilidade paramétrica para avaliar a influência na viabilidade econômica da flutuação nos preços dos insumos químicos. Os autores mostraram que híbridos que apresentam alta produtividade de campo e baixa recalcitrância resultam em melhor desempenho econômico na biorrefinaria. Além disso, reportaram que o insumo sulfito de sódio empregado no pré-tratamento da biomassa teve uma parcela significativa no custo de produção de etanol. Seus resultados identificaram os gargalos do processo, entre eles o custo de pré-tratamento, para a produção de etanol 1G2G a partir da biomassa da cana-de-açúcar, utilizando sulfito alcalino para pré-tratar a biomassa, apontando caminhos que a pesquisa na área equivalente deve ser direcionada.

Além da análise de viabilidade econômica, trabalhos também têm se preocupado com a sustentabilidade ambiental de biorrefinarias de etanol 2G. Luo et al. (2009), por exemplo, avaliando a produção brasileira de etanol a partir de caldo de cana-de-açúcar e propondo cenários nos quais o bagaço seria aproveitado para produção de eletricidade ou para produção de etanol, concluíram que a produção de eletricidade a partir do bagaço seria mais vantajosa do ponto de vista da emissão de gases de efeito estufa, sendo que a produção de etanol a partir deste material seria mais vantajosa do ponto de vista das demais categorias de impacto avaliadas. Parte dos dados utilizados pelos autores foi oriunda de publicação brasileira, e parte foi estimada utilizando-se bases de dados costumeiramente empregadas em ACV, como a ECOINVENT.

Em outro trabalho, Dias et al. (2012) avaliou diferentes cenários para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar, simulando condições de plantas industriais que produziram apenas etanol de segunda geração e de plantas integradas com processos já existentes de primeira geração. Neste trabalho, os autores fizeram uma análise técnico-econômica e também uma ACV para avaliar aspectos ambientais. Observou-se que o melhor cenário do ponto de vista econômico incluiu a integração da produção do biocombustível de segunda geração a processos de primeira geração, especialmente aproveitando as pentoses para produção do álcool e empregando técnicas avançadas de hidrólise, as quais incluem

deslignificação alcalina subsequente a um processo de explosão a vapor. Os autores concluíram também que, se o solvente empregado na deslignificação alcalina for recuperado, o processo apresenta ainda os melhores resultados do ponto de vista ambiental.

2.7 Conclusão

O aumento da necessidade energética da sociedade e a previsão de escassez das fontes de energia fósseis derivadas do petróleo incentivam esforços de pesquisas científicas a desenvolverem processos sustentáveis a partir de materiais lignocelulósicos para produzir biocombustíveis viáveis economicamente. O etanol de segunda geração é uma opção promissora no Brasil devido à disponibilidade de resíduos e subprodutos agrícolas distribuídos por todo território nacional. Realmente, o aproveitamento de resíduos e/ou subprodutos em um país agroindustrial como o Brasil é uma alternativa ambientalmente amigável que traz benefícios econômicos e sociais, favorecendo o desenvolvimento de processos sustentáveis. As diversas configurações de processo e alternativas existentes para a produção de etanol de segunda geração devem ser analisadas com o auxílio de ferramentas computacionais de simulação, as quais podem indicar pontos de melhoria nos processos sem necessidade extensiva de experimentação e também têm sido utilizadas para avaliação de sustentabilidade econômica e ambiental.

Referências

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675–685, 2011.

AHMED, A.; NASIM, F.H.; BATOOL, K.; BIBI, A. Microbial β -Glucosidase: Sources, Production and Applications. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**. v. 5 n. 1, p.31-46, 2017.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–61, 2010.

AL-ZUHAIR, S.; ALMENHALI, A.; HAMAD, I.; ALSHEHHI, M.; ALSUWAIDI, N.; MOHAMED, S. Enzymatic production of biodiesel from used/waste vegetable oils: Design of pilot plant. **Renewable Energy**, v. 36, p. 2605-2614, 2011.

ANTUNES, F.A.F.; CHANDEL, A.K.; BRUMANO, L.P.; TERAN HILARES, R.; PERES, G.F.D.; AYABE, L.E.S.; SORATO, V.S.; SANTOS, J.R.; SANTOS, J.C.; S.S. DA SILVA. A novel process intensification strategy for second-generation ethanol production from sugarcane bagasse in fluidized bed reactor. **Renewable Energy**, p. 1-8, 2017.

ASK, M.; OLOFSSON, K.; DI FELICE, T.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M.; LIDÉN, G.; OLSSON, L. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. **Process Biochemistry**, v. 47 p. 1452-1459, 2012.

AUXENFANS, T.; BUCHOUXA, S.; DJELLABB, K.; AVONDOA, C.; HUSSONA, E.; SARAZINA, C. Mild pretreatment and enzymatic saccharification of cellulose with recycled ionic liquids towards one-batch process. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 805– 813, 2012.

ÁVILA, P. F.; FORTE, M. B.S.; GOLDBECK, R. Evaluation of the chemical composition of a mixture of sugarcane bagasse and straw after different pretreatments and their effects on commercial enzyme combinations for the production of fermentable sugars. **Biomass and Bioenergy**, v.116, p.180-188, 2018.

BAGGA, P. S; SANDHU, D. K, S H A R M, S. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 61-68, 1990.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392 – 416, 1996.

BARCI, P. Unidade produtora de etanol 2G é inaugurada na Itália. Novo Portal Jornal da Cana, 2013. Disponível em: <http://www.jornalcana.com.br/noticia/Jornal-Cana/55039+Unidade-produtora-de-etanol-2G-e-inaugurada-na-Italia>. Acesso em: 12 de jun. 2019.

BINOD, P.; GNANSOUNOUB, E.; SINDHU, R., PANDEY, A.; Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v.5 p.317-325, 2019.

BNDES, 2014 Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/2496>. Acesso em: 16 jun. de 2019.

BONOMI, A. et al. **Virtual biorefinery**: an optimization strategy for renewable carbon valorization. Heidelberg: Springer International Publishing, 2016.

BORREGA, M.; SIXTA, H. Water prehydrolysis of birch wood chips and meal in batch and flow-through systems: a comparative evaluation. **Industrial and Engineering Chemical Research**, v. 54, p. 6075–6084, 2015.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4862-4874, 2009.

CARDOSO, T. F. et al. Technical and economic assessment of trash recovery in the sugarcane bioenergy production system. **Scientia Agricola**. v. 70, n. 5, p. 353-360, 2013.

CASTRO, A. M; PERREIRA, N. Jr. Produção, propriedades e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 33, p. 181-188, 2010.

CEISE, 2019. Proposta cria política nacional de biocombustíveis. Disponível em: <http://www.ceisebr.com/conteudo/aumento-da-producao-de-etanol-a-base-de-milho-pode-reduzir-preco-nas-bombas.html>. Acesso em: 13 jun. 2019.

CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. Biofuels in Brazil: Fundamental Aspects, Recents developments. **Future Perspective**. 1st ed. Springer. 2014. p. 2-8.

CHEN, H.; LIU, J.; CHANG, X.; CHEN, D.; XUE, Y.; LIU, P.; LIN, H.; HAN, S. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. **Fuel Processing Technology**, v.160, p.196-206, 2017.

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

CONAB, 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 04 jun. 2019.

DAYSTAR, J., REEB, C., GONZALEZ, R., VENDITTI, R., KELLEY, S.S. Environmental life cycle impacts of cellulosic ethanol in the Southern U.S. produced from loblolly pine, eucalyptus, unmanaged hardwoods, forest residues, and switchgrass using a thermochemical conversion pathway. **Fuel Processing Technology**, v. 138, p.164-174, 2015.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R. & BONOMI, A. Evaluation of process configurations for second generation integrated with first generation bioethanol production from sugarcane. **Fuel Processing Technology**, v.109 p. 84–89, 2013a.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; PAVANELLO, L. G.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; FILHO, R. M.; BONOMI, A. Cogeneration in integrated first and second generation ethanol from sugarcane. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, n. 8 p. 1411-1417, 2013b.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; MANTELATTO, P. E.; ROSSEL, C. E. V.; FILHO, R. M.; BONOMI, A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. **Applied Energy**, v. 109, p. 72-78, 2013c.

DIAS, M. O. S.; FILHO, R. M.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; LEAL, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v.15 p.35-51, 2015.

DI RISIO, S.; HU, C. S.; SAVILLE, B. A.; LIAO, D.; LORTIE, J. Large-scale, high- solids enzymatic hydrolysis of steam-exploded poplar. **Biofuels, Bioproducts and Biorifining**, v. 5, p. 609-620, 2011.

DOU, B.; ZHANG, H.; CUI, G.; WANG, Z.; JIANG, B.; WANG, K.; CHEN, H.; XU Y. Hydrogen production by sorption-enhanced chemical looping steamreforming of ethanol in an alternatingfixed-bed reactor: Sorbent to catalystratio dependencies. **Energy Conversion and Management**, v.55 p.243-252, 2018.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-19, 2010.

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

GAURAV, N.; SIVASANKARIB, S.; KIRANC, G, S.; NINAWEA, A.; SELVINB, J. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: a Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p.205-214, 2017.

GONZALEZ, R.; DAYSTAR, J.; JETT, M.; TREASURE, T.; JAMEEL, H.; VENDITTI, R.; PHILLIPS, R. Economics of cellulosic ethanol production in a thermochemical pathway for softwood, hardwood, corn stover and switchgrass. **Fuel Processing Technology**, v. 94, p. 113–122, 2012.

GOSLING, I. Process simulation and modeling for industrial bioprocessing: Tools and techniques. **Industrial Biotechnology**, v. 1, n. 2 p. 106-109, 2005.

GRANBIO, 2014 Disponível em: http://www.granbio.com.br/wp-content/uploads/2014/09/partida_portugues.pdf Acesso em: 02 jun. 2019.]

GURRAM, R. N.; MENKHAUS, T. J. Continuous Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass with Simultaneous Detoxification and Enzyme Recovery. **Applied Biochemistry Biotechnology**, p. 1319–1335, 2014.

HABIBI, Y., LUCIA, L.A., ROJAS, O.J., 2010. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. **Chem. Rev.** v.110 n.6, p.3479-3500, 2010.

HARRISON, R.G.; TODD, P.; RUDGE, S. R.; PETRIDES, D. P. Bioseparations Science and Engineering. **Oxford University Press**, v.2 p.220-280, 2003.

HATFIELD, R. D.; RANCOUR, D. M.; MARITA, J.M. Grass Cell Walls: a Story of Cross-Linking. **Frontiers in Plant Science**, v.18, 2017.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 564-573, 2012.

JUNQUEIRA, T. L. et al. Techno-economic analysis and climate change impacts of sugarcane biorefineries considering different time horizons. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 50, p. 1-12, 2017.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estud. av.** v.24, n.68, 2010.

KUMAR, P.; BARRET, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for efficient Hydrolysis and Biofuels Production. **Ind. Eng. Chem. Res.** v. 48, p. 3713-3729, 2009.

LAGO, A. C.; BONOMI, O. C.; CUNHA, M. P.; LIMA, M. A. P. Sugarcane as a carbon source: The Brazilian case. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 5-12, 2012.

LNBR – Laboratório Nacional de Biorrenováveis. Relatório anual da Biorrefinaria Virtual de cana-de-açúcar. 2011. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/108970905/Virtual-Sugarcane-Biorefinery-Report2011#fullscreen> Acesso em: 18 jul. 2019.

LOUREIRO, M. E.; BARBOSA, M. H. P.; LOPES, F. J. P.; SILVÉRIO, F. O. Sugarcane breeding and selection for more efficient biomass conversion in cellulosic ethanol. In: BUCKERIDGE, M.S., GOLDMAN, G.H. (Eds.) *Routes To Cellulosic Ethanol*. New York: Springer, 2011. p.199-239.

LYNDY, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnonology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

MAEDA, R. N.; SERPAB, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; ANNA, L. M. S.; CASTRO, A. M.; DRIEMEIERD, C. E.; PEREIRA JR, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* celulasas. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1196-1201, 2011.

MAURYA, D. P.; SINGLA, A.; NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **3 Biotech**, v.5, n. 5, p. 597–609, 2015.

MARIANO, A. P. et al. Utilization of pentoses from sugarcane biomass: techno-economics of biogas vs. butanol production. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 390-99, 2013.

MENDES, F.M., LAURITO, D.F., BAZZEGGIO, M., FERRAZ A., MILAGRES, A.M.F. Enzymatic Digestion of Alkaline-Sulfite Pretreated Sugar Cane Bagasse and Its Correlation with the Chemical and Structural Changes Occurring During the Pretreatment Step. **Biotechnology Progress**, v.4, p.890-895, 2013.

MENDES, F.M. et al. Alkaline sulfite pretreatment for integrated first and second generation ethanol production: a techno-economic assessment of sugarcane hybrids. **Biomass Bioenergy**, v. 119, p. 314-21, 2018.

MESQUITA, J. F. Alkaline-sulfite pretreatment and use of surfactants during enzymatic hydrolysis to enhance ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 441-448, 2016.

MODENBACH, A.; NOKES, S. E. The Use of High-Solids Loadings in Biomass Pretreatment—A Review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 6, 2012.

MORO, M. K. Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-rosca. 2015 (Dissertação de Mestrado): Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE. M.; LADISCH, M, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

MOUTTA, R. O.; LEITÃO, V. S. F.; BOM, E. P. S. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, ed. 1, p. 93-100, 2014.

MUSSATO, S. I. Biomass Pretreatment With Acids. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**, p. 169-185, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: 6, ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NOVACANA, Biorrefinaria: **futuro para o completo aproveitamento da biomassa de cana**. 2013. Disponível em: <https://www.novacana.com/estudos/biorrefinaria-futuro-para-o-completo-aproveitamento-da-biomassa-de-cana-241013/> Acesso em: 18 jul. 2019.

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, n. 5, p. 834-839, 2007.

OJEDA, K.; SÁNCHEZ, E.; EL-HALWAGI, M.; KAFAROV, V. Exergy analysis and process integration of bioethanol production from acid pre-treated biomass: comparison of SHF, SSF and SSCF pathways. **Chemical Engineer Journal**, v. 176–177, p. 195–201, 2011.

OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**, 2013 (Dissertação de Mestrado): Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba/SP, 2013.

OSTERGAARD, L. H.; OLSEN, H. S. Industrial applications of fungal enzymes. In: HOFRICHTER, M. (Ed.). **The Mycota**. A comprehensive treatise of fungi as experimental systems for basic and applied research. Book X: Industrial Applications. 2nd. ed. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. ISBN-13: 978-3642114571.

OWUSU, P.A., ASUMADU-SARKODIE, S., A review of renewable energy sources, sustainability issues and climate change mitigation. **J. Cogent. Eng.** 3, 1–14, 2016.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 5, p. 511-525, 2015.

RAÍZEN, 2014. Disponível em: <http://www.raizen.com.br/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/etanol-de-segunda-geracao>. Acesso em: 12 jun. 2019.

RIVERA, E. C. et al. A screening design to analyze the influence of technological configurations on techno-economic parameters for autonomous distilleries in Brazil. **Chemical Engineering Transactions**, v. 37, p. 307-312, 2014.

ROCHA, G.J.M., NASCIMENTO, V.M., GONCALVES, A.R., SILVA, V.F.N., MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physicalchemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015.

RUEDA, S. M. G. **Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**, 2010 (Dissertação de Mestrado), Campinas/SP: Universidade Estadual de Campinas, 2010.

RUFFATO-FERREIRA, V.; BARRETO, R. C.; JÚNIOR, A. O.; SILVA, W. L.; VIANA, D. B.; NASCIMENTO, J. A. S. A foundation for the strategic long-term planning of the renewable energy sector in Brazil: Hydroelectricity and wind energy in the face of climate change scenarios. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72 p. 1124-1137, 2017.

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.

SANTOS, L. V.; DE BARROS GRASSI, M. C.; GALLARDO, J. C. M.; PIROLLA, R. A. S.; CALDERÓN, L. L.; DE CARVALHO-NETTO, O. V.; PEREIRA, G. A. G. Second-Generation Ethanol: the Need is Becoming a Reality. **Industrial Biotechnology**, v.12, p.40–57, 2016.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SILVA, V. F. N. et al. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 7, 809-817, 2011.

SILVA, L, **Estudo da hidrólise enzimática em alta consistência de materiais lignocelulósicos**, 2012 (Dissertação de Mestrado): Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2012.

SINDHU, R.; KUTTIRAJA, M.; PRABISHA, T. P.; BINOD, P.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Development of a combined pretreatment and hydrolysis strategy of rice straw for the production of bioethanol and biopolymer. **Bioresource Technology**, v. 215 p. 110-116, 2016.

SONG, Y.; CHO, E. J.; PARK, C.S.; HOON OH, C.; PARK, B.J.; BAE H.J. A strategy for sequential fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* in bioethanol production from hardwoods. **Renewable Energy**, v.189 p.1281-1289, 2019.

TAVARES, J. et al. Hydrothermal alkaline sulfite pretreatment in the delivery of fermentable sugars from sugarcane bagasse. **New Journal of Chemistry**, v. 42, p. 4474-4484, 2018.

TERÁN-HILARES, R.; RESÉNDIZ, A.L.; MARTÍNEZ, R.T.; SILVA S.S.; SANTOS, J.C. Successive pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane bagasse in a packed bed flow-through column reactor aiming to support biorefineries. **Bioresource technology**, v.203 p.42- 49, 2016.

TYAGI, S.; LEE, K. J.; MULLA, S. I.; GARG, N.; CHAE, J.C. Production of Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Current Approaches and Perspectives. **Applied Microbiology and Bioengineering**, p. 21-42, 2019.

WANG, J. et al. Impact of lignin content on alkaline-sulfite pretreatment of Hybrid Pennisetum. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 793-796, 2018.

WEIFENG et al. Modeling, Simulation and Optimization of a Whole Industrial Catalytic Naphtha Reforming Process on Aspen Plus Platform. **Journal Chemical Engineering**, v.14 n.5, p.584-591, 2006.

WYMAN, C. E. **Handbook on Bioethanol: Production and Utilization**. Washington: Taylor Francis, p. 417, 1996.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y.Y. Comparative sugar recovery and fermentation data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 2026–2032, 2005.

WU, L.; ARAKANE, M.; IKE, M.; WADA, M.; TAKAI, T.; GAU, M.; TOKUYASU, K. Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production. **Bioresource Technology**, v.102, p.4793-4799, 2011.

YÁÑEZ-S, M.; ROJAS, J.; CASTRO, J.; RAGAUSKAS, A.; BAEZA, J.; FREER, J. Fuel ethanol production from Eucalyptus globulus wood by autocatalized organosolv pretreatment ethanol-water and SSF. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 88 p. 39-48, 2012.

YASUDA, M.; NAGAI, H.; TAKEO, K.; ISHII, Y.; OHTA, K. Bio-ethanol production through simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of a low-moisture anhydrous ammonia (LMAA)-pretreated napiegrass (Pennisetum purpureum Schumach). SpringerPlus, p. 1-8, 2014.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas Imobilizadas, In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, Ribeirão Preto: Legis Summa, Cap. 4, p. 35-85, 2004.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 4, p. 465–482, 2012.

VALADARES, F. L. **Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico**, 2013. 122 p (Dissertação de Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, SP, 2013.

VANHOLME, R. et al. Towards a carbon-negative sustainable bio-based economy. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 174, 2013.

VAN ZYL, W. H.; CHIMPHANGO, A. F. A.; DEN HAAN, R.; GÖRGENS, J. F.; CHIRWA, P. W. C. Next-generation cellulosic ethanol technologies and their contribution to a sustainable Africa. **Interface focus**, v. 1, p. 196-211, 2011.

ZHANG, X-Z.; ZHANG, Y-H, P. Cellulases: characteristics, sources, production and applications, In: YANG, S-T.; ENSHASY, H, E.; THONGCHUL, N, (Ed.), **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2013, p. 131– 146, ISBN-13: 978-0470541951, ISBN-10: 0470541954.

ZHU, J.Y.; PAN, X.J.; WANG, G.S.; GLEISNER R. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource Technology**, v.100, p.2411-2418. 2009.

ZHU, Z.; REZENDE, C. A.; SIMISTER, R.; MCQUEEN-MASON, S. J.; MACQUARRIEA, D. J.; POLIKARPOV, I.; GOMEZ, L. D. Efficient sugar production from sugarcane bagasse by microwave assisted acid and alkali pretreatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 93 p. 269-278, 2016.

3 AVALIAÇÃO DE CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO/COFERMENTAÇÃO EM SEPARADO (SHF/SHCF) EM REATORES DE COLUNA

RESUMO

A avaliação das etapas biológicas em biorrefinarias de materiais lignocelulósicos – hidrólise enzimática e fermentação – em biorreatores é fundamental para o desenvolvimento de processos susceptíveis de ampliação de escala. Neste trabalho, empregou-se reator de coluna de leito fixo para a etapa de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Avaliou-se a influência de variáveis importantes na hidrólise enzimática (razão mássica sólido:líquido no reator e vazão de recirculação), empregando como ferramentas planejamento estatístico e modelos matemáticos. Também foi avaliada a fermentação e cofermentação em reatores de coluna, variando-se a aeração utilizada. Inicialmente, o bagaço foi pré-tratado com solução de sulfito alcalino e submetido à hidrólise enzimática em reator de coluna de leito fixo, carregado com diferentes teores iniciais de sólidos. O leito do reator foi composto por bagaço pré-tratado e, através deste, recirculou-se uma solução contendo preparação comercial de celulasas. O uso de menor teor de sólidos na hidrólise enzimática (9%) resultou em 41 gL^{-1} de glicose no hidrolisado, correspondendo a 87% de rendimento de hidrólise da glucana. O rendimento de hidrólise da glucana foi reduzido para 65% quando o teor de sólidos usado foi de 16%, correspondendo a uma concentração de glicose de 54 gL^{-1} . Posteriormente, o hidrolisado obtido foi utilizado para a produção de etanol em diferentes vazões de aeração (0,3; 0,5 e 0,7 vvm). empregando reator de coluna de bolhas, sendo utilizadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Scheffersomyces stipitis*. O melhor desempenho de fermentação (fator de rendimento em produto, Y_p/s , de $0,40 \pm 0,02 \text{ gg}^{-1}$ e produtividade volumétrica, Q_p , de $1,58 \pm 0,04 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) e cofermentação (Y_p/s de $0,31 \pm 0,01 \text{ gg}^{-1}$ e Q_p de $0,64 \pm 0,015 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) em batelada simples foi obtido utilizando a aeração de 0,5 vvm. Com esta aeração, foi realizado o reciclo de células para a condução das fermentações em bateladas repetidas. Tanto os processos fermentativos realizados em batelada simples quanto os realizados em bateladas repetidas exibiram desempenho semelhante quando se utilizou *S. cerevisiae* e uma produtividade volumétrica mais elevada quando se utilizou *S. stipitis*. Desta forma, demonstrou-se o potencial dos biorreatores de colunas como sistemas simples para uso nas etapas biológicas das biorrefinarias.

Palavras chave: Bagaço de cana-de-açúcar; Reatores de coluna; Hidrólise enzimática; Etanol de segunda geração; Fermentação com reciclo de células.

3.1 Introdução

Os processos de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar são geralmente conduzidos em biorreatores, nos quais a mistura reacional, constituída pelo meio de cultivo (ou de substrato para conversão enzimática) e o agente biológico, são mantidos sob condições pré-estabelecidas para a realização das conversões enzimáticas e/ou metabólicas. Neste reator, ou biorreator, vários fenômenos químicos, físicos e biológicos ocorrem. Por essa razão, o desenvolvimento de cada processo deve levar em consideração a cinética das reações bioquímicas, as características hidrodinâmicas do reator, processos de transferência de massa (nutrientes e oxigênio), além do controle da fisiologia microbiana responsável pela bioconversão (MCNEIL; HARVEY, 2008). No entanto, comumente é encontrado na literatura trabalhos utilizando frascos Erlenmeyer, os quais são úteis para selecionar condições de hidrólise enzimática, mesmo sendo limitados a uma baixa carga de sólidos insolúveis (TRAVAINI et al., 2013; YU et al., 2011). Em frascos, dependendo da carga de sólidos utilizada, é necessário um longo período de tempo até a completa solubilização (liquefação) do substrato para alcançar uma hidrólise efetiva, diminuindo assim a produtividade do processo (ZHANG et al., 2009). Algumas opções de biorreatores têm sido relatadas tanto para a etapa de hidrólise enzimática quanto para a etapa de fermentação no processo de produção de etanol 2G, sendo que, entre as diversas variáveis que devem ser consideradas, o teor de sólidos carregado no sistema de hidrólise enzimática é uma das mais importantes. São numerosos os relatos na literatura utilizando reatores com baixo carregamento de sólidos ($\leq 5\%$ de sólidos, m / m). No entanto, considerando-se a necessidade de melhorar eficiência do processo, os efeitos de elevado carregamento de sólidos ($\geq 15\%$ de sólidos, m/m) em diferentes operações unitárias dentro do processo têm sido relatados nos últimos anos (MODENBACH e NOKES, 2012; BORREGA e SIXTA, 2015).

Neste sentido, recentemente, o grupo do Laboratório de Biopolímeros, Biorreatores e Simulação de Processos (LBBSIM)/EEL-USP relatou o uso de reatores de coluna com leito fixo (“packed bed flow-through column reactor”) para o pré-tratamento e hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar visando à produção de etanol. Este relato foi publicado por Terán-Hilares et al. (2016), tendo os autores empregado 13,2% de sólidos no reator de hidrólise enzimática e observado que cerca de 30 g/L de glicose e 10 g/L de xilose foram liberados do material pré-tratado em cerca de 24h de processo de hidrólise enzimática. O potencial do sistema foi demonstrado, sendo necessários trabalhos de otimização visando ao aumento no rendimento da hidrólise da celulose, que foi de cerca de 50% (calculado com base

em glicose liberada) no material pré-tratado por processo alcalino. Os biocombustíveis obtidos a partir de materiais lignocelulósicos apresentam vantagens como a grande disponibilidade de matéria-prima, possibilitando sua produção sem competição com a cadeia de obtenção de alimentos ou necessidade de expansão da fronteira agrícola. Além disso, o balanço global de carbono demonstra seu elevado potencial para a redução da emissão de CO₂ na atmosfera (BNDES e CDEE, 2008; GONZALEZ et al., 2012).

Nos últimos anos, esforços têm sido conduzidos para viabilização de biorrefinarias integradas de etanol 1G e 2G, sendo que o beneficiamento de materiais lignocelulósicos é interessante para um país agroindustrial como o Brasil, trazendo benefícios sociais, econômicos e ambientais (SILVA et al., 2010; TETE, 2016). Atualmente, há inclusive algumas plantas demonstrativas e empresas iniciando a produção de etanol de segunda geração em escala industrial (GRANBIO, 2014; SANTOS et al., 2016). No entanto, há muitos gargalos no processo e estudos são necessários para favorecer sua viabilidade.

As tecnologias em desenvolvimento incluem etapas de pré-tratamento e hidrólise das frações carboidrato visando a liberar açúcares para o processo fermentativo (AGBOR et al., 2011; GALBE e ZACCHI, 2012). O objetivo do pré-tratamento é favorecer a hidrólise enzimática da celulose presente no material. A hemicelulose, por sua vez, pode também ser hidrolisada na etapa de pré-tratamento ou na etapa enzimática, dependendo da tecnologia selecionada. Neste caso, resíduos e subprodutos agrícolas como o bagaço de cana-de-açúcar quando são usados como matéria-prima, liberam-se pentoses no hidrolisado. Para a fermentação destas, podem-se empregar microrganismos geneticamente modificados ou leveduras capazes de fermentar pentoses naturalmente, como *Candida shehetae* e *Scheffersomyces stipitis* (ANTUNES et al., 2016; BIDEAUX et al., 2016).

Diversas opções têm sido avaliadas para a condução das etapas biológicas do processo como hidrólise enzimática e fermentação (BALCÃO et al., 2004; TERÁN-HILLARES et al., 2017). Visando a sua aplicação industrial, no entanto, são necessários estudos de opções de processo e reatores que favoreçam sua aplicação em larga escala. Entre as opções de biorreator, sistemas de colunas são interessantes, apresentando vantagens como simplicidade de construção e baixo custo (Terán-Hillares et al., 2017).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação da influência de condições de hidrólise e fermentação de hexoses ou cofermentação de hexoses e pentoses em reatores de coluna, visando à produção de etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Hidrólise enzimática foi conduzida em sistemas com leito fixo empregando diferentes

quantidades iniciais de sólidos no reator e a fermentação foi realizada em reator de coluna de bolhas empregando células de *Saccharomyces cerevisiae* ou *Scheffersomyces stipitis*.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Matéria-prima e caracterização

O bagaço de cana-de-açúcar foi gentilmente fornecido pela Usina Vale Onda Verde, localizada no município de Onda Verde/SP. As amostras foram secas até obter um teor de umidade em torno de 10%. Após a secagem, o bagaço foi triturado em moinho de martelo, procedendo-se à análise granulométrica em peneiras padrão série Tyler, montadas em um agitador de peneiras adquirido da Bertel Indústrias Metalúrgicas Ltda. (Caieiras – SP).

As amostras moídas foram caracterizadas quanto a seus componentes (extrativos, teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas).

3.2.2 Pré-tratamento sulfito alcalino

Para a realização do pré-tratamento utilizou-se a fração de bagaço que ficou retida em peneiras de 28 Mesh, correspondendo a partículas maiores que 0,60mm. O pré-tratamento foi efetuado em reator de coluna possuindo uma altura de 460 mm e com diâmetro interno de 220 mm, correspondendo a um volume de 17.486 mL. Baseando-se no trabalho de Mendes et al. (2015), o bagaço foi desaerado (em Kitassato de 5 litros por 30 minutos) utilizando uma bomba de vácuo, sendo posteriormente levado para o interior do reator com uma quantidade de 600g de bagaço (massa seca) e com 6L da solução de sulfito alcalino $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$ empregando-se a proporção de 10% m/m e 5% m/m de cada reagente, respectivamente, em relação à massa seca de biomassa. O bagaço foi novamente desaerado dentro do reator por 15 minutos e levado para a autoclave. O processo foi realizado por 2h a uma temperatura de 121°C em autoclave. Após esse período, o bagaço pré-tratado foi separado do meio líquido por filtração e lavado com água destilada. Este procedimento foi realizado até que a água de lavagem atingisse pH=7. Posteriormente, o bagaço pré-tratado foi caracterizado com relação aos seus componentes principais (celulose, hemicelulose e lignina).

3.2.3 Avaliação das condições de hidrólise em frascos Erlenmeyer

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL, preparou-se um meio reacional composto por tampão citrato 50 mM pH 4,8, bagaço pré-tratado em uma concentração 7% m/m e uma preparação comercial de celulase de *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) com atividade enzimática inicial do extrato de 80 FPU/g e o complexo de celulases e hemicelulases rico em β -glicosidase NS50012 (Novozymes Latin America Ltda., Araucária, PR, Brasil).

Os frascos permaneceram em incubadora por 24h a 50°C e 150 rpm, em um agitador orbital. Após este período, a enzima foi inativada a 100°C por 5 minutos, sendo o meio posteriormente centrifugado a 3000g. A fração líquida foi recuperada e utilizada para a respectiva análise de açúcares utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme TERÁN-HILARES et al., (2016).

O rendimento de hidrólise (RH) foi determinado de acordo com a Eq. (1), reportada por Lu et al. (2012).

$$RH(\%) = \frac{G * V * 0,9}{Gl * m} \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que:

G=conteúdo de glicose liberada após hidrólise enzimática, V= volume total do meio reacional, 0,9 Gl=conteúdo total de glucana e m=massa de bagaço utilizada para hidrólise.

Na equação 1 há uma multiplicação por 0,9, pois, quando a glucana é hidrolisada a glicose, ocorre a incorporação de uma molécula de água em cada uma das ligações glicosídicas presentes no polissacarídeo. A incorporação da molécula de água representa o aumento de 18 g/mol em cada molécula de anidroglicose (162 g/mol) presente no polissacarídeo. Assim, quando a glucana é hidrolisada à glicose, a massa obtida é maior que a de glucana originalmente presente na biomassa.

O rendimento de hidrólise da xilana (RH) foi determinado de acordo com a Eq. (2),

$$RH(\%) = \frac{X * V * 0,88}{Xl * m} \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que:

X=conteúdo de xilose (g/L) liberada após hidrólise enzimática, V= volume (ml) total do meio reacional, XI=conteúdo total de xilana, m=massa seca de bagaço pré-tratado fornecido para hidrólise.

Na equação 2 há uma multiplicação por 0,88, pois, quando a xilana é hidrolisada a xilose ocorre a incorporação de uma molécula de água em cada uma das ligações glicosídicas presentes no polissacarídeo. A incorporação da molécula de água representa o aumento de 18 g/mol em cada molécula de anidroxilose (132 g/mol) presente no polissacarídeo. Assim, quando a xilana é hidrolisada à xilose, a massa obtida é maior que a de xilana originalmente presente na biomassa.

A hidrólise enzimática foi avaliada através de um planejamento composto central rotacional (2^2), com cinco repetições no ponto central, para determinar a melhor carga enzimática a se utilizar nesta combinação de enzimas. As variáveis consideradas neste estudo foram a concentração de Celulases de *Trichoderma longibrachiatum* (FPU/g) e concentração de β -glicosidase NS50012 (U/g), ambas as concentrações por grama de bagaço, tendo como variável resposta a % de hidrólise enzimática. A matriz do planejamento experimental é apresentada na Tabela 1.

Para o respectivo desenho do planejamento experimental e análise de resultados, foi empregado o Software Design Expert ® (Stat-Ease, Inc). As condições otimizadas desse planejamento foram utilizadas em reatores de coluna nos experimentos subsequentes.

Tabela 3.1 - Matriz do planejamento composto central rotacional empregado para avaliação do efeito das variáveis carga de celulases por grama de bagaço de *Trichoderma longibrachiatum* (FPU/g) e carga de β -glicosidase NS50012 (UI/g) no desempenho da hidrólise enzimática das frações carboidrato de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino (valores codificados entre parênteses).

Experimento	Carga de Celulases (FPU/g)	Carga de β - glicosidase (UI/g)
1	5 (-1)	5 (-1)
2	15 (+1)	5 (-1)
3	5 (-1)	15 (+1)
4	15 (+1)	15 (+1)
5	10 (0)	10 (0)
6	10 (0)	10 (0)
7	10 (0)	10 (0)
8	10 (0)	10 (0)
9	10 (0)	10 (0)
10	2,93 (-1,41)	10 (0)
11	17,07 (+1,41)	10 (0)
12	10 (0)	2,93 (-1,41)
13	10 (0)	17,07 (+1,41)

Fonte: Próprio autor

3.2.4 Avaliação das condições de hidrólise enzimática em reator de coluna com leito fixo

O processo de hidrólise enzimática da fração celulósica do bagaço foi avaliado em biorreator de coluna com diâmetro interno de 30 mm e volume 160 mL, conforme esquema simplificado e fotografia apresentada na Figura 3.1. A coluna principal, construída em vidro, apresentava uma camisa para controle de temperatura. O interior desta coluna principal foi preenchido com o leito, composto de aproximadamente 30 g (massa seca) de material pré-tratado. A recirculação foi realizada com o auxílio de bomba peristáltica, resultando em um fluxo ascendente de fluido no leito. O meio reacional era composto por tampão citrato 50 mM pH 4,8 com uma preparação comercial de celulase *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) suplementada com um complexo de hemicelulases e celulases rico em β -glucosidase NS50012 (Novozymes Latin America Ltda., Araucária, PR,

Brasil). O reator foi operado a 50°C por 24 horas, sendo retiradas alíquotas periódicas para análise do teor de açúcares por HPLC.

Figura 3.1 - Esquema simplificado (a) e fotografia do reator utilizado na hidrólise enzimática dos polissacarídeos de bagaço de cana-de-açúcar (reator de leito fixo) (b).

a

b

Fonte: Próprio autor

O carregamento de sólidos no reator (razão mássica sólido:líquido inicial no reator) e a vazão de recirculação utilizada nos experimentos foram ajustadas de acordo com o planejamento estatístico composto central rotacional (Tabela 3.2). Foi utilizado o software Statistica versão 12.5 para avaliar os efeitos das variáveis na % de hidrólise da glucana e da xilana na concentração de açúcares obtida no hidrolisado (glicose e xilose).

Tabela 3.2 - Matriz do planejamento composto central rotacional empregado para avaliação do efeito das variáveis razão mássica sólido/líquido carregada no reator e vazão de recirculação no reator no desempenho da hidrólise enzimática das frações carboidrato de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino (valores codificados entre parênteses).

Experimento	Razão mássica sólido/líquido (%)	Vazão de recirculação (mL/min)
1	10 (-1)	25 (-1)
2	15 (+1)	25 (-1)
3	10 (-1)	36 (+1)
4	15 (+1)	36 (+1)
5	8,96 (-1,41)	30,5 (0)
6	16,04 (+1,41)	30,5 (0)
7	12,5 (0)	22,7 (-1,41)
8	12,5 (0)	38,3 (+1,41)
9	12,5 (0)	30,5 (0)
10	12,5 (0)	30,5 (0)
11	12,5 (0)	30,5 (0)
12	12,5 (0)	30,5 (0)
13	12,5 (0)	30,5 (0)

Fonte: Próprio autor

3.2.5 Modelagem matemática dos experimentos de hidrólise enzimática conduzidos em frascos Erlenmeyer e reatores de coluna

A hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado foi realizada utilizando-se uma preparação comercial de glucanase de *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma-Aldrich, Brasil) suplementada com celobiose NS50012 (Novozymes Latin America Ltda., PR, Brasil). A biomassa pré-tratada foi suspensa em uma solução tampão citrato 50 mM de pH 4,8 contendo 17 FPU de glucanase e 4 UI de β -glicosidase por grama de bagaço, essa carga enzimática foi determinada no primeiro planejamento de experimentos, conforme o item 3.2.3. Os experimentos foram realizados com diferentes teores iniciais de sólidos em frascos Erlenmeyer (2%, 5%, 7%) de 50 mL carregados com 15 mL de bagaço e preparo de suspensão enzimática. O biorreator de coluna descrito no item 3.2.4 foi usado para realizar a hidrólise com maiores teores de sólidos (9%, 12,5%, 16%), sendo 0,160 L do meio líquido

recirculados com o auxílio de uma bomba peristáltica (vazão de 22,7 mL/min), resultando em um fluxo ascendente constante através do leito. O reator foi operado em modo descontínuo a 50 ° C por 24 horas.

As amostras foram coletadas a partir do início do experimento (0 h) e ao longo de 24 h. As enzimas foram inativadas por tratamento térmico (100 ° C, 5 min) e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000g. Os sobrenadantes foram utilizados para determinar as concentrações de glicose e xilose em função do tempo de reação. As concentrações de glicose e xilose potencial após cada ensaio experimental foram calculadas com base na massa seca e na composição química antes e após a reação enzimática.

Após a sacarificação, o hidrolisado obtido no reator foi concentrado a vácuo a 60 °C em um rotaevaporador até a concentração de glicose atingir 100 g L⁻¹.

Para modelagem cinética dos resultados experimentais, dois modelos foram considerados: o de Cao e De La Cruz, Eq. 3 (Cao e De La Cruz, 2013); e o de Chrastil, Eq. 4 (Chrastil, 1988).

$$[P] = V_0/n (1 - e^{-nt}) \quad (\text{Eq.3})$$

Em que:

P = concentração do produto;

V₀ = velocidade inicial de reação;

η = termo que descreve a redução na velocidade da hidrólise enzimática que causa o comportamento não linear ao longo do tempo;

t = tempo de reação.

$$P = P_{\infty} [1 - \exp(-k' E_0 t)]^n \quad (\text{Eq.4})$$

Em que:

P e P_∞ = Concentrações de produtos que se difundem no tempo t e no equilíbrio, respectivamente.

k' = Taxa constante proporcional ao coeficiente de difusão definido pela lei de Fick;

E₀ = Concentração inicial de enzima;

n = Constante de resistência à difusão estrutural dependente da estrutura estérica do sistema. Este parâmetro reflete a ordem de reação aparente. Quando a resistência à difusão é pequena, n tende a 1. Se o sistema for fortemente limitado pela resistência à difusão, n é pequeno.

3.2.6 Fermentação e cofermentação

3.2.6.1 Microrganismo e inóculo

Os microrganismos utilizados foram *Saccharomyces cerevisiae* IR2 e *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124, ambos disponíveis no Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena-Universidade de São Paulo, e armazenados em Ágar extrato de malte a 4°C. O preparo do inóculo foi feito em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio composto por 30 g/L de glicose (para *S. cerevisiae*) ou xilose (para *S. stipitis*), 10 g/L de peptona bacteriológica e 10 g/L de extrato de levedura. O cultivo foi realizado em um agitador rotativo por 24h a 30 °C e 200 rpm. Posteriormente, as células foram recuperadas por centrifugação a 3000g por 15 min, lavadas e ressuspensas em água destilada para obtenção de uma suspensão com elevada densidade celular ($X_o = 20 \text{ g L}^{-1}$), a qual foi utilizada como inóculo. Nos experimentos utilizando *S. stipitis*, a concentração de levedura foi determinada por meio de medições de densidade ótica a 600 nm, em espectrofotômetro Beckman DU640B. As medidas de absorbância foram correlacionadas com a concentração celular (em g L^{-1}) por uma curva de calibração. Para os experimentos com *S. cerevisiae*, a biomassa inicial foi medida através da determinação da massa seca após a secagem da biomassa em estufa a 105 °C.

3.2.6.2 Fermentação e cofermentação em batelada simples

O processo fermentativo foi conduzido na mesma coluna utilizada na etapa de hidrólise, porém com as devidas adaptações necessárias para a realização da fermentação (asepsia e aeração). O meio de fermentação foi composto por hidrolisado obtido a partir do processo de hidrólise enzimática descrito previamente e nutrientes (5 g/L peptona bacteriológica, extrato de levedura 3 g/L, extrato de malte 3 g/L e sulfato de amônio 0,25 g/L). As fermentações ocorreram em biorreatores de coluna de bolhas durante 48h a 30°C. Os experimentos foram realizados em triplicata empregando diferentes vazões de aeração (0,3 vvm, 0,5 vvm e 0,7 vvm). Amostras foram removidas periodicamente para análise de açúcares, etanol e biomassa.

3.2.6.3 Fermentação e cofermentação com reciclo de células

Nos experimentos com *Saccharomyces cerevisiae* IR2, após 24 horas de fermentação, a aeração foi interrompida para que ocorresse a decantação das células de levedura flocculantes dentro do reator. Em seguida, foi realizada a drenagem do meio fermentado e o reator foi carregado com um novo meio de fermentação, hidrolisado suplementado com os nutrientes (condições descritas na secção 3.2.5). Para os experimentos com *S. stipitis*, foi realizado um procedimento semelhante, mas com etapas adicionais realizadas após a drenagem do reator, uma vez que esta cepa não é flocculante. As células foram centrifugadas a partir do meio fermentado a 3000 g durante 15 min e adicionadas novamente no reator junto com o hidrolisado suplementado para uma batelada de cofermentação. Estas etapas foram realizadas sob condições assépticas e o reciclo das leveduras *S. stipitis* foi realizado a cada 96 horas.

3.2.6.4 Parâmetros de fermentação

- a) Fator de rendimento (ou de conversão) de açúcar (açúcares redutores totais) em etanol ($Y_{p/s}$, g etanol/g açúcar)

$$Y_{p/s} = \Delta P / (-\Delta S) = (P_f - P_i) / (S_i - S_f) \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que:

P_f: concentração final de produto

P_i: concentração inicial de produto

S_f: concentração final de açúcar

S_i: concentração inicial de açúcar

- b) Fator de rendimento (ou de conversão) de açúcar (açúcares redutores totais) em células ($Y_{x/s}$, g células/g açúcar)

$$Y_{x/s} = \Delta X / (-\Delta S) = (X_f - X_i) / (S_i - S_f) \quad (\text{Eq. 6})$$

Em que:

Xf: concentração celular final

Xi: concentração celular inicial

c) Produtividade volumétrica em etanol (Q_p , g etanol/(L.h))

$$Q_p = (P_f - P_i) / t \quad (\text{Eq. 7})$$

Em que:

t: tempo de fermentação.

3.2.7 Métodos Analíticos

A umidade do bagaço de cana-de-açúcar foi determinada em balança de infravermelho Mark M163 (BEL Engineering, Piracicaba-SP).

Tanto o bagaço *in natura* quanto pré-tratado foram caracterizados quanto a seus componentes (celulose, hemicelulose, lignina e cinzas), seguindo a metodologia descrita por Mesquita; Ferraz; Aguiar (2016).

As análises dos teores de açúcares, ácido acético e etanol foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Agilent Technology 1200 series (Agilent, Estados Unidos). As amostras foram previamente filtradas em filtro Sep Pak C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração RID 6A; fase móvel ácido sulfúrico 0,005 mol/L e fluxo de 0,6 mL/min.

A atividade celulolítica foi determinada conforme metodologias descritas por Ghose (1987) e Bailey et al., (1992) para determinação da quantidade de preparação de celulasas que deveria ser adicionada ao meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.

A concentração celular foi determinada por turbidimetria por leitura de absorbância a 600 nm empregando um espectrofotômetro (Beckman DU640B, USA). As medidas de absorbância foram correlacionadas com a concentração celular (g/L) mediante uma curva de calibração a ser determinada.

3.3 Resultado e Discussão

3.3.1 Granulometria e caracterização composicional do bagaço de cana-de-açúcar empregado nos experimentos

O tamanho da partícula é importante em reações químicas, considerando-se que partículas menores apresentam maior superfície de contato e isso resulta em maiores taxas de reação. Grande diversidade de tamanho é encontrada em amostras de bagaço, pois esta é uma biomassa heterogênea devido aos procedimentos de corte no campo e do processamento industrial (SOARES e ROSSELL, 2009). Assim, visando ao uso em laboratório, a uma melhor eficácia nos processos e a uma maior homogeneidade das amostras empregadas, o bagaço foi moído em moinho de martelo e o resultado da análise granulométrica realizada nas amostras moídas é apresentado na Figura 3.2, na forma de histograma.

Figura 3.2 - Análise granulométrica do bagaço moído em moinho de martelo. Obs.: 1. Análise diferencial; 2. valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Fonte: Próprio autor

Em uma análise granulométrica reportada por Soares e Rossell (2009) para amostras de bagaço de cana-de-açúcar oriundas de usina, foram obtidos os seguintes valores médios: fibras acima de 25 mm correspondiam de 5 a 10% da amostra, fibras entre 5 e 25 mm de 30 a 50% e partículas finas entre 1 e 8 mm de 5 a 10%. Considerando esta informação e os resultados obtidos (Figura 3.2), demonstra-se a eficácia do uso do moinho de martelo na

redução do tamanho das partículas do bagaço, pois é possível verificar que, após a moagem, apenas 3,1% da amostra tem tamanho superior a 3,33 mm.

Utilizou-se o bagaço retido na peneira de 28 Mesh, ou seja, partículas com tamanho médio superiores a 0,60 mm, que correspondem a 70% da amostra de bagaço utilizado. Esta opção foi devido a resultados de experimentos preliminares, os quais mostraram que o uso das frações mais finas resultaria em elevada perda de carga no reator de coluna a ser empregado na hidrólise enzimática.

Após a moagem e análise granulométrica, realizou-se a caracterização química do bagaço *in natura* (denominou-se *in natura* o bagaço após a moagem), cujo resultado é apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Caracterização química do bagaço *in natura* (média±desvio padrão).

Componentes	%
Extrativo	4,0 ± 0,2
Lignina Total	23,2 ± 1,7
Glucana	41,4 ± 1,5
Xilana	22,1 ± 1,0
Arabinosil	1,9 ± 0,1
Cinzas	3,1 ± 0,2
Acetil	3,1 ± 0,1
Total	98,8 ± 3,7

Fonte: Próprio autor

Como pode ser observado na Tabela 3, no bagaço *in natura* a fração hemicelulósica correspondeu a 27,1% (Xilana+arabinosil+acetil), enquanto a celulose correspondeu à maior parte do material, representando 41,4 % do total (glucana). Esses valores são de uma forma geral, semelhantes aos encontrados na literatura, como apresentado na Tabela 3.4, apenas com um teor de hemicelulose um pouco superior nas amostras usadas no presente trabalho.

Tabela 3.4 - Composição química percentual do bagaço in natura: dados da literatura

Referência	Componentes principais do bagaço in natura (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Silva et al. (2016)	40,1	23,7	23,0
Visser et al. (2015)	52,8	20,7	22,1
Khuong et al. (2014)	40,7	19,8	23,4
Rocha et al. (2012)	42,4	22,9	21,5

Fonte: Próprio autor

As diferenças apresentadas nos teores dos componentes principais podem ser atribuídas a diversos fatores específicos do próprio vegetal. Ernesto (2009) menciona que características como variedade do vegetal, irrigação do solo, clima do local e tempo decorrido após a última colheita são alguns dos fatores determinantes na composição química do material. Além disso, Santos et al. (2011) relatam que o tempo de estocagem, assim como altos teores de umidade na amostra, podem interferir nessas características químicas e, por isso, é interessante a utilização do bagaço imediatamente após sua produção, para evitar longos períodos de armazenamento e possíveis alterações. A fim de evitar problemas relacionados ao armazenamento no laboratório, é ideal que o bagaço esteja com valores de umidade próximos a 10%. Para a realização deste trabalho, a amostra foi previamente seca ao sol, apresentando umidade de 11,25%.

3.3.2 Pré-tratamento e caracterização química do bagaço pré-tratado

O bagaço, após pré-tratamento com solução de sulfito alcalino - Na_2SO_3 (10% m/m)/NaOH (5% m/m), foi caracterizado quanto aos seus componentes químicos, sendo os resultados dessa caracterização apresentados na Tabela 3.5.

Considerando-se a massa total de sólidos recuperada, o pré-tratamento teve um rendimento de 79,7%. Com base nos resultados apresentados na Tabela 3.5, em comparação aos dados da Tabela 3.3, verifica-se que o teor de celulose no bagaço passou de 41,4% para 47,1%, enquanto o teor de lignina reduziu de 23,2% para 13,2%, indicando a eficácia do pré-tratamento sulfito alcalino utilizado na alteração da composição química do bagaço. De fato, Chen et al. (2015) menciona que o pré-tratamento altera a estrutura complexa dos materiais lignocelulósicos, permitindo melhor ação enzimática na etapa de hidrólise. Isso ocorre pela

redução do teor de lignina, que no material lignocelulósico é o componente responsável pela rigidez da parede celular, dificultando o acesso das enzimas ao substrato (JORGENSEN, et al. 2007).

Tabela 3.5 - Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com solução de sulfito alcalino - Na₂SO₃ 10% m/m e NaOH 5% m/m (resultados apresentados como média±desvio padrão).

Componentes	%
Extrativo	0,0
Lignina Total	13,2 ± 0,8
Glucana	47,1 ± 0,7
Xilana	23,3 ± 1,1
Arabinosil	0,9 ± 0,1
Cinzas	3,6 ± 0,2
Acetil	0,2 ± 0,01
Total	88,4 ± 1,6

Fonte: Próprio autor

No estudo reportado por Laurito-Friend (2015), no qual se relatou a influência da concentração dos reagentes no pré-tratamento sulfito alcalino, utilizando diferentes cargas de sulfito (5%, 7,5% e 10% m/m) e de hidróxido de sódio (2,5%, 3,75% e 5% m/m), os autores observaram que, conforme se empregou uma maior concentração de reagentes, maior foi a remoção de lignina e de hemicelulose, favorecendo a hidrólise enzimática. A maior remoção de lignina facilita o acesso das enzimas ao substrato sendo que, nesse caso, o efeito da sulfonação foi essencial para maiores conversões, pois a lignina residual após a sulfonação se torna mais hidrofílica e isso reduz as interações desta com as enzimas. Em outro trabalho, Mendes et al. (2015) estudaram as modificações químicas e físicas após o pré-tratamento sulfito alcalino através de microespectrofotometria UV e observação de alterações na absorção de água e dos grupos sulfônicos nas fibras. Os autores observaram a formação de ranhuras na parede celular da casca, principalmente na interface casca-medula após a deslignificação parcial, sendo que a fração de carboidratos aumentou e houve uma diminuição no teor de lignina.

Portanto, a redução do teor lignina é essencial para o aumento do rendimento da hidrólise e o pré-tratamento utilizado mostrou-se eficaz nesse aspecto, resultando em uma redução de 56% em relação ao valor inicial no teor de lignina após o pré-tratamento. Houve uma pequena remoção de hemicelulose.

Considerando-se o rendimento mássico global do processo, pôde-se calcular a remoção das frações macromoleculares do material. A remoção de lignina foi de 54%, enquanto a de hemicelulose foi de 28,3%. Houve ainda uma pequena remoção de celulose no pré-tratamento, correspondente a uma perda de 9,33% deste componente. Esses valores estão de acordo com dados reportados por Friend (2013) que, utilizando o mesmo pré-tratamento, calculou a remoção de lignina e também da hemicelulose para diferentes cultivares de cana-de-açúcar. Em todos os cultivares, a remoção da hemicelulose foi menor que a remoção da lignina, observando-se também que com o aumento na carga dos reagentes, a remoção de ambos os componentes também aumenta.

3.3.3 Hidrólise enzimática do material pré-tratado em frascos erlenmeyer

Com o bagaço pré-tratado, realizaram-se hidrólises enzimáticas em frascos Erlenmeyer na temperatura de 50°C a 150 rpm por 48 h, com diferentes cargas enzimáticas por massa de bagaço. Esse primeiro planejamento experimental foi realizado a fim de se determinar a condição otimizada da combinação de enzimas comerciais a serem empregadas: preparação comercial de celulase de *Trichoderma longibrachiatum* e um complexo de celulases rico em β -glicosidase NS50012. Estas foram selecionadas com base na disponibilidade no laboratório e em trabalhos anteriores. No trabalho de MENDES et al. (2013) empregou-se preparação comercial de celulases de *Trichoderma reesei* (SIGMA-ALDRICH, 2016). A preparação de β -glicosidase empregada neste trabalho, no entanto, não está mais disponível no mercado, empregando-se então a preparação NS50012, disponível no grupo de pesquisas.

A atividade das preparações enzimáticas foi quantificada e são apresentadas na Tabela 3.6. Conforme mostrado na Tabela 3.6, a preparação comercial de celulases de *T. longibrachiatum* não apresentou atividade de celobiase, indicando assim a necessidade de suplementação com a preparação de β -glicosidase NS50012. Esta suplementação se faz necessária, pois ocorre uma inibição por produto durante a hidrólise enzimática da celulose. As celulases são inibidas por glicose, celobiose ou ambos produtos, sendo assim, a ação conjunta das enzimas melhora o rendimento da hidrólise, em especial por impedir o acúmulo

de celobiose, a qual tem sido relatada como inibitória à ação do complexo celulolítico em concentrações de celobiose acima de $2,6 \text{ g L}^{-1}$, sendo a atividade das celulasas diminuídas em 50% nessa concentração e completamente inibidas em uma concentração de 12 g L^{-1} (MURRAY, 1986).

Tabela 3.6 - Atividade enzimática das preparações comerciais de enzimas utilizadas na reação de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino.

Atividade enzimática por grama de preparado enzimático	celulase de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	β -glicosidase NS50012
Atividade total (FPU/g)	80	Não detectada
Celobiase (U/g)	0	69,57
Xilanase (UI/g)	1792	Não detectada
CMCase (U/g)	1109	Não detectada

Fonte: Próprio autor

De fato, as diferentes celulasas atuam sinergicamente e resultam em um meio rico em glicose, ou seja, sua atuação conjunta resulta em rendimento de hidrólise mais elevado que a soma dos rendimentos obtidos utilizando as enzimas individualmente. A representação quantitativa desta ação conjunta é normalmente expressa em grau de sinergismo (GS), dado pela razão entre a atividade das misturas e a soma das atividades separadas (ZHANG e LYND, 2004).

Os resultados das hidrólises enzimáticas conduzidas em frascos Erlenmeyer conforme o planejamento estatístico, estão apresentados na Tabela 3.7. Conforme mostrado na Tabela 3.7, o rendimento de hidrólise variou de 36,67% até 75,50 %, sendo que menor rendimento foi correspondente ao experimento 1 (carga enzimática 5 FPU/g e 5 UI/g), apresentando uma concentração $13,43 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e $8,78 \text{ g L}^{-1}$ de xilose. A maior digestibilidade enzimática (maior rendimento de hidrólise da celulose) foi obtida no experimento nº 11 (carga de enzimas 17,07 FPU/g e 10 UI/g), resultando em uma concentração de $27,66 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e $13,47 \text{ g L}^{-1}$ de xilose no hidrolisado. Todos os experimentos apresentaram celobiose, porém em uma concentração bem inferior ao de glicose e xilose, variando de uma concentração $0,51$ a $4,25 \text{ g L}^{-1}$.

Tabela 3.7 - Digestibilidade enzimática de bagaço de cana-de-açúcar sob diferentes cargas de preparações comerciais de celulasas por massa de bagaço: reações conduzidas em frascos Erlenmeyer segundo um planejamento experimental 2² estrela rotacional. Tempo de reação: 24 horas.

Corrida	Condições		Resultados			
	Carga de celulase de <i>T. longibrachiatum</i> (FPU/g)*	Carga de β -glicosidase (UI/g)*	Concentração de	Concentração de	Concentração de	Rendimento de
			Glicose no hidrolisado (g L ⁻¹)	Xilose no hidrolisado (g L ⁻¹)	celobiose no hidrolisado (g L ⁻¹)	hidrólise da celulose (%)
1	5 (-1)	5 (-1)	13,43	8,78	2,09	36,67
2	15 (+1)	5 (-1)	27,26	13,0	2,76	74,42
3	5 (-1)	15 (+1)	21,53	14,20	4,26	58,79
4	15 (+1)	15 (+1)	30,21	15,63	2,88	70,41
5	10 (0)	10 (0)	25,94	12,83	3,75	70,70
6	10 (0)	10 (0)	25,05	13,79	1,82	68,88
7	10 (0)	10 (0)	26,12	14,07	3,62	71,31
8	10 (0)	10 (0)	25,71	12,81	1,76	70,20
9	10 (0)	10 (0)	26,42	13,73	1,89	72,12
10	2,93 (-1,41)	10 (0)	12,92	9,94	2,46	35,29
11	17,07 (+1,41)	10 (0)	27,66	13,47	2,62	75,50
12	10 (0)	2,93 (-1,41)	22,60	11,95	2,91	61,69
13	10 (0)	17,07(+1,41)	27,20	15,04	2,62	74,24

*atividade enzimática por massa de bagaço empregada na reação; **razão entre a quantidade de glicose liberada e a máxima possível considerando-se a composição em celulose do material pré-tratado

Fonte: Próprio autor

Procedeu-se então à análise de variância - ANOVA (Tabela 3.8) para um modelo quadrático (Eq. 8), o qual foi composto para a variável resposta rendimento de hidrólise da celulose em função das variáveis carga de celulasas de *T. longibrachiatum* e carga de β -glicosidase. Pela análise da significância dos coeficientes do modelo (Tabela 3.8), pode-se observar que todos os fatores estudados têm influência significativa sobre o rendimento de hidrólise da celulose, a um nível de confiança de 95%.

A análise de variância demonstrou que o modelo quadrático ajustado apresentou um valor de coeficiente de determinação de 0,9918, indicando que o modelo pode explicar 99,18% de variabilidade da resposta (rendimento de hidrólise enzimática) dentro da faixa de valores estudada. O ajuste satisfatório do modelo também foi indicado por sua significância ($p < 0,01$) e pela ausência de significância da falta de ajuste ($p > 0,10$) (Tabela 3.8).

Tabela 3.8 - Análise de variância para um modelo quadrático composto para o rendimento de hidrólise em função da carga de cada uma das preparações comerciais de enzimas utilizadas.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	p-valor
Modelo	2193,62	5	438,72	169,29	< 0,0001*
X ₁	1410,75	1	1410,75	544,35	< 0,0001*
X ₂	160,73	1	160,73	62,02	0,0001*
(X ₁) ²	448,05	1	448,05	172,88	< 0,0001*
(X ₂) ²	21,07	1	21,07	8,13	0,0246*
X ₁ X ₂	170,69	1	170,69	65,86	< 0,0001*
Resíduo	18,14	7	2,59		
Falta de ajuste	12,21	3	4,07	2,74	0,1772
Erro puro	5,93	4	1,48		
Total	2211,76	12			

$R^2 = 0,9918$

X₁=carga de celulase (FPU/g), X₂= carga β-glicosidase(U/g) *Significativo ao nível de confiança de 95%

Fonte: Próprio autor

A qualidade do modelo também pode ser verificada pela proximidade entre os valores preditos e os observados, conforme mostrado na Figura 3.3.

$$Y_1 = -30,07 + 11,69X_1 + 4,90X_2 - 0,32(X_1)^2 - 0,069(X_2)^2 - 0,26 X_1X_2 \quad \text{Eq. (8)}$$

Em que:

Y_1 = Rendimento de hidrólise da celulose (%), X_1 =carga de celulase (FPU/g), X_2 = carga β -glicosidase (U/g).

Empregou-se então a ferramenta de otimização numérica do programa Design-Expert, adotando-se como critérios a maximização do rendimento de hidrólise da celulose, dando-se preferência ao uso de maior carga de celulase de *T. longbrachiatum* e menor carga de β -glicosidase.

Figura 3.3 - Valores preditos e observados para a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino. Os valores preditos foram calculados com base no modelo quadrático da Equação 8.

Fonte: Próprio autor

A Figura 3.4 (a,b) mostra que, se uma elevada carga de celulase (acima de 10 FPU/g) for utilizada, pode se empregar menor carga de β -glicosidase, não afetando a variável resposta hidrólise enzimática (%), que permanece elevada nessa condição de trabalho. Assim, selecionou-se como condição o uso de menor carga enzimática de β -glicosidase, o que se justifica pela dificuldade de obtenção de β -glicosidase no mercado para desenvolvimento de trabalhos de pesquisa. De fato, o fornecedor Sigma-Aldrich, que disponibilizava preparações comerciais desta enzima para aquisição, não a possui mais em seu catálogo e a amostra disponível atualmente no laboratório é limitada.

Figura 3.4 - Superfície de resposta (a) e Curva de Nível (b) mostrando a influência da carga enzimática de celulase (FPU/g) e β -glicosidase (UI/g) na hidrólise da celulose

(a)

(b)

Fonte: Próprio autor

Com o procedimento de otimização (no qual se priorizou o menor gasto de β -glicosidase), obtiveram-se as seguintes condições ótimas: carga enzimática de 16,4 FPU/g de celulase e 4,38 U/g de β -glicosidase, sendo o valor predito de rendimento de hidrólise enzimática da celulose de $76,65 \pm 4,2$ % (média $\pm$ intervalo de confiança de 95%). Procedeu-se então a um experimento nestas condições, sendo o resultado experimental obtido de rendimento de hidrólise da celulose de $77,83 \pm 1,69$ % (média $\pm$ desvio padrão), confirmando-

se assim a predição do modelo. As condições otimizadas foram então empregadas na sequência dos experimentos em reator de coluna.

3.3.4 Hidrólise enzimática em coluna com leito fixo percolado

Procedeu-se a um segundo planejamento experimental (2^2 composto central rotacional), realizado com o objetivo de avaliar o efeito de duas variáveis no desempenho da hidrólise enzimática das frações carboidrato de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino. As variáveis estudadas foram razão mássica sólido/líquido no carregamento do reator e vazão de recirculação da solução enzimática.

Em todos os experimentos, acompanhou-se o perfil cinético da hidrólise enzimática, avaliando-se a formação de açúcares (glicose e xilose) ao longo de 24 horas de reação. A partir do início processo até duas horas de reação, foram retiradas alíquotas a cada 15 min, sendo depois disso retiradas alíquotas a cada duas horas. Os resultados de cada experimento de hidrólise são apresentados na Figura 3.5(a,b).

Figura 3.5 - Concentração de glicose (a) e xilose (b) em função do tempo de hidrólise enzimática em reator de coluna com leito fixo com diferentes carregamentos de sólidos e vazões de recirculação, conforme planejamento estatístico definido na Tabela 3.2 (para as replicatas no ponto central, apresentaram-se os valores de média $\pm$ desvio padrão)

(Continua)

(Conclusão)

Fonte: Próprio autor

Conforme pode ser observado, houve liberação de glicose e xilose em todos os experimentos, sendo que a concentração final da pentose foi correspondente a cerca de 50% da concentração final de glicose obtida. Este comportamento pode ser explicado considerando-se que o pré-tratamento sulfito alcalino não remove elevada quantidade de hemicelulose (MENDES et al., 2011), permanecendo então esta fração na biomassa pré-tratada. De fato, no pré-tratamento sulfito alcalino, a remoção da lignina foi 54%, diminuindo a recalcitrância do material e consequentemente aumentando a acessibilidade da enzima ao substrato (celulose e hemicelulose). Assim, como grande parte da hemicelulose permanece no material e como as preparações comerciais de celulasas possuem também xilanases, ocorre liberação de xilose durante a hidrólise. A presença de xilanases nas preparações comerciais tem como objetivo favorecer a hidrólise da celulose. De fato, no trabalho de Visser et al. (2015), os pesquisadores relataram que a elevada atividade de xilanases em complexos enzimáticos influenciam a eficiência da hidrólise da celulose e, para que haja aumento na concentração de glicose, é necessária a remoção de xilose da amostra.

Como também se pode observar na Figura 3.5, de uma forma geral, houve uma elevada liberação de glicose no início da hidrólise, atingindo-se, nas duas primeiras horas de processo, pelo menos 42% do total liberado em 24h. Comportamento similar foi observado no caso da hidrólise da hemicelulose, obtendo-se nas duas primeiras horas de reação de hidrólise pelo menos 44% do total de xilose liberado em 24h.

Elevadas taxas iniciais de hidrólise da celulose foram observadas também por Siqueira et al. (2013), os quais, trabalhando com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com clorito de sódio e ácido acético, observaram taxa de hidrólise elevada nas primeiras 4 h, sendo a conversão de celulose em glicose considerada ideal (cerca de 80%) atingida no tempo de 8 h de processo. Esses pesquisadores sugerem que essa diminuição na taxa de hidrólise ao longo do tempo se deve à recalcitrância crescente do material residual, pois as frações de maior facilidade para hidrólise são digeridas pelas celulasas nos primeiros momentos de reação, sendo a celulose restante menos acessível às enzimas. Outro fator que pode contribuir com a diminuição da taxa de reação ao longo do processo é a inibição por produto. Realmente, quando se utiliza maior razão sólido:líquido no reator, pode-se acumular elevada concentração de açúcares monoméricos e celobiose. A concentração de celobiose, mesmo utilizando a enzima β -glucosidase, foi elevada nos experimentos com teor de sólidos mais elevados, atingindo uma concentração $4,25 \text{ g L}^{-1}$, indicando que existe a possibilidade de aumentar a carga enzimática de β -glucosidase (dependendo da disponibilidade do mercado) para obter rendimentos mais elevados. A inibição por glicose, embora com menor efeito, também ocorre, sendo necessária uma concentração de $36,4 \text{ g L}^{-1}$ para diminuir a atividade das celulasas em 50% (MURRAY, 1986). A cinética da hidrólise enzimática da celulose tem sido estudada há mais de 50 anos, porém a complexidade destes mecanismos de hidrólise e a influência de diversos parâmetros dificulta a criação de um modelo cinético genérico e confiável. A reação de hidrólise é instável e de natureza dinâmica devido à influência de diversos fatores, como inibição por intermediários (celobiose), inibição por produto (glicose), a alteração na estrutura da celulose durante a reação, a ação sinérgica das enzimas do grupo celulolítico, entre outros fatores (diversidade de pré-tratamentos, diferentes configurações de processo) (GAN; ALLEN; TAYLOR, 2003). Procedeu-se à análise estatística dos resultados obtidos com a execução do planejamento experimental. As variáveis resposta consideradas foram rendimento de hidrólise da celulose (%), rendimento de hidrólise da hemicelulose (%), concentração de glicose (g L^{-1}) e concentração de xilose (g L^{-1}), todos obtidos no tempo de 24h de processo. Estes dados estão mostrados na Tabela 3.9. Na tabela, pode-se observar que os rendimentos de hidrólise (%) variaram de 50,55 até 81,15 % para a celulose e de 52,90 até 84,00 % para a hemicelulose. Também se pode observar nos experimentos com menor razão mássica sólido/líquido, uma menor concentração de açúcares (glicose e xilose) ao final das 24 horas de reação. A concentração máxima de glicose obtida foi de $53,09 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que a de xilose foi $28,60 \text{ g L}^{-1}$. A Figura 3.6 apresenta o gráfico de Pareto, cujas barras representam os efeitos padronizados relacionados às variáveis resposta.

Tabela 3.9 - Digestibilidade enzimática de bagaço de cana-de-açúcar sob diferentes valores de razão mássica sólido/líquido e vazão de recirculação: reações conduzidas em reator de coluna segundo um planejamento experimental 2² estrela rotacional. Tempo de reação: 24 horas.

Corrida	Variáveis estudadas		Variáveis resposta			
	Razão mássica sólido/líquido (%)	Vazão de recirculação (mL/min)	Hidrólise da Celulose (%)	Hidrólise da Hemicelulose (%)	Concentração de Glicose (g L ⁻¹)	Concentração de Xilose (g L ⁻¹)
1	10 (-1)	25 (-1)	73,94	85,36	38,73	22,62
2	15 (+1)	25 (-1)	50,55	66,48	39,83	26,36
3	10 (-1)	36 (+1)	80,39	80,63	42,07	21,20
4	15 (+1)	36 (+1)	66,54	68,52	52,32	27,25
5	8,96 (-1,41)	30,5 (0)	71,16	52,9	40,69	15,31
6	16,04 (+1,41)	30,5 (0)	69,82	61,4	52,53	23,05
7	12,5 (0)	22,7 (-1,41)	81,15	73,7	53,09	26,47
8	12,5 (0)	38,3 (+1,41)	76,52	86,5	50,02	28,60
9	12,5 (0)	30,5 (0)	65,23	71,3	42,63	23,59
10	12,5 (0)	30,5 (0)	73,37	72,3	47,95	23,92
11	12,5 (0)	30,5 (0)	66,83	74,3	43,72	24,59
12	12,5 (0)	30,5 (0)	74,99	74,2	49,27	25,97
13	12,5 (0)	30,5 (0)	74,40	84	50,63	27,80

Fonte: Próprio autor

Na figura, os efeitos dos fatores A₁ (razão mássica de sólido/líquido no reator) e A₂ (vazão de recirculação), foram considerados estatisticamente significativos ao nível de confiança de 90% quando as barras que os representam ultrapassaram a linha vertical p=0,1. A análise dos gráficos Pareto revelou que, com 90% de confiança, a variável A₁ - razão mássica sólido/líquido, apresentou um efeito linear negativo e significativo no rendimento de hidrólise da celulose e um efeito quadrático negativo e significativo no rendimento de hidrólise da hemicelulose. Apresenta ainda um efeito linear significativo positivo na concentração de glicose e também na concentração de xilose, além de um efeito quadrático negativo na concentração de xilose. Já variável A₂- vazão de recirculação no reator, por sua

vez, apresentou um efeito quadrático significativo positivo na concentração de xilose ($p < 0,1$) e no rendimento de hidrólise da hemicelulose ($p = 0,1$). O efeito negativo da concentração de sólidos no reator no rendimento de hidrólise enzimática da celulose pode estar relacionado a dificuldades de transferência de massa quando o leite apresenta elevada concentração de bagaço de cana-de-açúcar.

Pode também estar relacionado à inibição por produto, uma vez que, mesmo com menor rendimento, a elevada concentração de sólidos favoreceu a obtenção de maiores concentrações de glicose no hidrolisado Figura 3.6 (a,b).

Figura 3.6 - Gráfico de Pareto para o efeito das variáveis (linear e quadrático) A1 (razão mássica de sólido/líquido no reator) e A2 (vazão de recirculação), nas variáveis resposta (a) rendimento de hidrólise da celulose (%); (b) concentração de glicose (g L^{-1}), c) rendimento de hidrólise da hemicelulose (%) e (d) concentração de xilose (g L^{-1}), todas correspondentes a 24h de processo.

Fonte : Próprio autor

Neste caso, o uso de processos de sacarificação e fermentação ou co-fermentação em simultâneo poderia favorecer o processo. Procedeu-se então a uma análise de variância para um modelo quadrático para as variáveis resposta em função razão mássica sólido/líquido e da vazão de recirculação no reator. Os resultados são apresentados nas Tabela 3.10 a Tabela 3.13.

Tabela 3.10 - Análise de variância para um modelo quadrático composto para o rendimento de hidrólise da celulose em função da razão mássica sólido/líquido e vazão de recirculação.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	<i>p</i> -valor
Modelo	315,67	5	63,13	1,01	0,4768
A ₁	191,44	1	191,44	3,06	0,1236
A ₂	31,57	1	31,57	0,50	0,5003
(A ₁) ²	22,75	1	22,75	0,36	0,5654
(A ₂) ²	26,15	1	26,15	0,42	0,5384
A ₁ A ₂	34,71	1	34,71	0,56	0,4805
Resíduo	437,65	7	62,52		
Falta de ajuste	353,88	3	117,96	5,63	0,0641**
Erro puro	83,77	4	20,94		
Total	753,32	12			
R ² = 0,4190					

*Significativo ao nível de confiança de 95%, ** Significativo ao nível de confiança de 90%

Fonte : Próprio autor

Tabela 3.11 - Análise de variância para um modelo quadrático composto para a concentração de glicose em função da razão mássica sólido/líquido e vazão de recirculação.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	<i>p</i> -valor
Modelo	161,97	5	32,39	1,32	0,3556
A ₁	98,66	1	98,66	4,02	0,0850**
A ₂	16,50	1	16,50	0,67	0,4393
(A ₁) ²	20,93	1	20,93	0,85	0,3865
(A ₂) ²	17,28	1	17,28	0,70	0,4291
A ₁ A ₂	5,59	1	5,59	0,23	0,6478
Resíduo	171,79	7	24,54		
Falta de ajuste	122,83	3	40,94	3,34	0,1370
Erro puro	48,96	4	12,24		
Total	333,75	12			
$R^2 = 0,4853$					

*Significativo ao nível de confiança de 95%, ** Significativo ao nível de confiança de 90%

Fonte : Próprio autor

Tabela 3.12 - Análise de variância para um modelo quadrático composto para o rendimento de hidrólise da hemicelulose em função da razão mássica sólido/líquido e vazão de recirculação

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	<i>p</i> -valor
Modelo	646,01	5	129,20	1,90	0,2126
A ₁	44,98	1	44,98	0,66	0,4428
A ₂	29,69	1	29,69	0,44	0,5298
(A ₁) ²	11,46	1	11,46	0,17	0,6937
(A ₂) ²	378,82	1	378,82	5,57	0,0503**
A ₁ A ₂	116,69	1	116,69	1,72	0,2315
Resíduo	475,86	7	67,98		
Falta de ajuste	372,99	3	124,33	4,83	0,0810**
Erro puro	102,87	4	25,72		
Total	1121,87	12			
$R^2 = 0,5758$					

*Significativo ao nível de confiança de 95%, ** Significativo ao nível de confiança de 90%

Fonte : Próprio autor

Tabela 3.13 - Análise de variância para um modelo quadrático composto para a concentração de xilose em função da razão mássica sólido/líquido e vazão de recirculação (o termo correspondente à interação A1, A2 foi excluído desta análise por apresentar baixa significância).

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor F	p-valor
Modelo	129,66	4	32,41	15,23	0,0008*
A ₁	53,75	1	53,75	25,26	0,0010*
A ₂	0,77	1	0,77	0,36	0,5641**
(A ₁) ²	52,49	1	52,49	24,67	0,0011*
(A ₂) ²	14,24	1	14,24	6,69	0,0323**
Resíduo	17,02	8	2,13		
Falta de ajuste	5,07	4	1,27	0,42	0,7867
Erro puro	11,95	4	2,99		
Total	146,68	12			
R ² = 0,8840					

*Significativo ao nível de confiança de 95%, ** Significativo ao nível de confiança de 90%

Fonte : Próprio autor

Conforme mostrado, apenas para a variável concentração de xilose pôde-se obter um modelo quadrático satisfatório, o qual foi significativo ($p < 0,05$), sem falta de ajuste significativa ($p > 0,1$) e com valor de R^2 de 0,88. O modelo ajustado foi empregado para composição de uma superfície de resposta ilustrados na Figura 3.7.

A análise da Figura 3.7(a,b) mostra que a maior concentração de xilose pode ser obtida no hidrolisado trabalhando-se com valores intermediários de razão mássica sólido/líquido, sem grande influência da vazão de recirculação.

Esta vazão, portanto, pode ser selecionada como a mínima avaliada, uma vez que o uso de elevadas vazões resulta em dificuldades relacionadas à perda de carga na coluna, acar-

Figura 3.7 - Superfície de resposta (a) e Curva de Nível (b) mostrando a influência da razão de sólido:líquido (%) e vazão de recirculação (mL/min) na variável resposta concentração de xilose (g L^{-1}).

Fonte: Próprio autor

retando entupimento e vazamentos. Neste caso, empregando-se a ferramenta de otimização numérica do programa Design-Expert, e colocando-se como critérios a maximização da concentração de xilose (desejável para futuros trabalhos de co-fermentação) usando a mínima vazão de recirculação, obtêm-se como condições de trabalho : razão sólido/líquido de 14% e vazão de recirculação de 22,7 mL/min, Neste caso, o modelo prevê a obtenção de 28 g L^{-1} de xilose. Assim, com base na análise dos resultados, uma razão sólido/líquido de 14% e vazão

de recirculação de 22,7 mL/min resulta em maximização da concentração de xilose no hidrolisado e, conforme a análise dos dados da Tabela 3.9 e dos gráficos de Pareto da Figura 3.6, poder-se-ia obter, nestas condições, elevados valores de concentração de glicose e rendimento de hidrólise da celulose. De fato, como apenas a razão mássica sólido/líquido no reator (Figura 3.7) apresentou efeito significativo sobre a concentração de glicose e no rendimento de hidrólise da celulose, sendo estes efeitos positivo e negativo, respectivamente, um valor intermediário de sólidos poderia favorecer a obtenção de valores aceitáveis para estas variáveis respostas.

Visando-se à confirmação do modelo obtido para a concentração de xilose, um novo experimento foi executado na condição otimizada, obtendo uma concentração de xilose de $29,33 \pm 2,4 \text{ g L}^{-1}$, esse resultado de acordo com a predição do modelo que foi 28 g L^{-1} .

Procedeu-se, em seguida, a uma melhor investigação da influência do teor de sólidos no processo, inclusive tendo como objetivo avaliar qual a causa de redução no rendimento de hidrólise enzimática com maior carregamento de sólidos. Para isto, foram realizados experimentos com diferentes carregamentos iniciais de sólidos em frascos Erlenmeyer e em biorreator de leito fixo, empregando-se modelos matemáticos para auxiliar na análise dos resultados. Nas melhores condições, procedeu-se a uma sequência de experimentos de fermentação e cofermentação.

3.3.5 Modelagem matemática da hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado por sulfito alcalino em frascos erlenmeyer e em reator de leito fixo utilizando diferentes teores de sólidos

O bagaço proveniente do pré-tratamento sulfito alcalino foi hidrolisado em frascos Erlenmeyer e em reatores de coluna para investigar a influência do teor de sólidos na hidrólise de suas frações carboidrato. Nos frascos Erlenmeyer, a hidrólise da glucana diminuiu de 78% para 70% quando o teor de sólido foi aumentado de 2 para 7%. A hidrólise da xilana diminuiu

de forma semelhante (de 90% para 70%) nestes sistemas à medida que o teor de sólidos foi aumentado (Tabela 3.14).

Tabela 3.14 - Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado em diferentes teores de sólidos em frascos de Erlenmeyer e em reator de coluna de leito fixo (carga enzimática de 16,4 FPU/g de celulase e 4,38 U/g de β -glicosidase). Os resultados correspondem a 24 horas de hidrólise e são apresentados como valores médios e desvio-padrão de hidrólises em triplicata

Sistema	Teor de sólidos	Concentração de glicose (g L ⁻¹)	Concentração de xilose (g L ⁻¹)	Hidrólise da Glucana (%)	Hidrólise da Xilana (%)
Erlenmeyer	2%	8,2 ± 1,0	4,6 ± 0,7	78,0 ± 2,2	87,8 ± 3,1
	5%	19,9 ± 1,4	10,1 ± 0,8	73,3 ± 1,4	76,2 ± 2,7
	7%	25,8 ± 1,2	12,8 ± 1,3	70,1 ± 1,3	68,5 ± 3,4
Reator de leito fixo	9%	41,4 ± 2,1	18,8 ± 1,9	86,7 ± 1,7	74,9 ± 2,5
	12.5%	47,2 ± 3,1	26,1 ± 2,2	77,4 ± 2,4	79,1 ± 3,8
	16%	54,4 ± 1,2	24,9 ± 1,6	65,1 ± 1,9	71,8 ± 2,3

Fonte: próprio autor

Nas reações conduzidas em reator utilizou-se uma vazão de recirculação de 1,38 L/h ou 22,7 mL/min, correspondendo a uma lavagem completa do volume do reator (0,160 L) em 0,12 h (tempo espacial). O teor de sólidos no reator foi aumentado até 16% sem limitar o fluxo ou causar obstrução do leito. As concentrações de glicose e xilose liberadas são mostradas na Figura 3.8.

Conforme mostrado, empregando-se o menor teor de sólidos (9%), 41g L⁻¹ de glicose e 19 g L⁻¹ de xilose foram produzidos em 24 h, correspondendo aos rendimentos de hidrólise de glucana e xilana de 87% e 75%, respectivamente (Tabela 3.15). Essas eficiências de hidrólise foram similares às reações conduzidas em frascos Erlenmeyer (Tabela 3.15 e Figura 3.8). Aumentar o teor de sólidos no reator até 16% resultou em concentrações elevadas de glicose (54 g L⁻¹) e xilose (25 g L⁻¹) no hidrolisado. No entanto, as conversões de glucana e xilana em monossacarídeos diminuíram para 65% e 72%, respectivamente, como resultado do aumento do teor de sólidos.

Figura 3.8 - Concentrações de açúcares no hidrolisado enzimático obtido usando diferentes teores de sólidos (a) em frascos de Erlenmeyer e (b) no reator de leito fixo. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão

Fonte: próprio autor

Diminuições na eficiência de hidrólise com aumentos do teor sólido no reator podem ser explicadas por limitações de transferência de massa, inibição das enzimas pelos produtos e adsorção improdutivo de enzimas no bagaço pré-tratado (PRATTO et al., 2016; GAN, ALLEN, TAYLOR, 2003). No caso do bagaço pré-tratado com sulfito alcalino, a adsorção improdutivo de celulasas pode ser mitigada pela presença de grupos funcionais carregados negativamente na lignina residual (MENDES et al., 2015; SIQUEIRA et al., 2017). Em

relação à inibição de enzimas por produtos de hidrólise (YANG et al., 2006), celobiose e/ou xilo-oligossacarídeos acumulam-se no hidrolisado que é recirculado pelo reator de leito fixo, uma vez que foram detectados 10 g L^{-1} destes para o teor de sólidos de 9% e 15 g L^{-1} para o teor de sólido de 16% (após 24 horas de reação). Com o objetivo de investigar os efeitos da inibição por produto e/ou limitações de transferência de massa, os dados experimentais de concentração de glicose foram ajustados empregando dois modelos cinéticos denominados Cao e De La Cruz e modelo cinético Chrautil (Figura 3.9).

Figura 3.9 - Concentração experimental de glicose (g L^{-1}) e curvas ajustadas pelos modelos de Cao e De La Cruz (—) e Chrautil (---) para hidrólise enzimática realizada com diferentes carregamentos de sólidos em frascos Erlenmeyer (a, b, c) e (d, e, f) em biorreator de leito fixo de fluxo contínuo. Os carregamentos de sólidos utilizados foram de 2% (a), 5% (b), 7% (c), 9% (d), 12,5% (e) e 16% (f). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão

Figura 3.9 (a)

Tempo (h)

(Continua)

(Continuação)

Figura 3.9 (b)

Figura 3.9 (c)

(Continuação)

(Continuação)

Figura 3.9 (d)

Figura 3.9 (e)

(Continuação)

(Conclusão)

Figura 3.9 (f)

Fonte: Próprio autor

Os dados experimentais para as reações em frascos de Erlenmeyer foram devidamente ajustados ao modelo de Cao e De La Cruz. Entretanto, os dados das reações em reator de coluna não foram ajustados apropriadamente por esse modelo cinético.

O modelo de Cao e De La Cruz considera a cinética enzimática em estado estacionário, sendo os parâmetros cinéticos associados à inibição do produto e/ou depleção do substrato. De acordo com Cao e De La Cruz (2013), v_0 neste modelo é a velocidade inicial da cinética enzimática (sem inibição por produto ou depleção do substrato) e η é o termo que descreve a redução na velocidade que causa a não linearidade ao longo do tempo. Nos experimentos realizados, maiores valores de v_0 foram obtidos em frascos de Erlenmeyer quando o teor de sólidos foi aumentado de 2% para 7%, chegando a $15,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Valores de v_0 comparativamente maiores foram obtidos no reator de coluna ($23\text{-}29 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), indicando que o uso de um reator de proporcionou um aumento na velocidade da reação de hidrólise enzimática. A hidrólise da xilana exibiu comportamento similar ao observado para a hidrólise da glucana (Figura 3.8).

No modelo de Cao e De La Cruz, a não linearidade é caracterizada pela depleção do substrato ou inibição dos subprodutos da enzima, especialmente quando $\eta > \tau^{-1}$, onde τ é o intervalo de tempo de aquisição dos dados. Em nossos experimentos, η foi maior que τ^{-1} em todos os casos e aumentou quando o teor de sólidos nos frascos Erlenmeyer foi aumentado de 2% para 7%, mas permaneceu em 0,6-0,8 no reator de coluna (Tabela 3.15). Valores crescentes de η indicam um regime em que há inibição enzimática pelos produtos (Cao e De La Cruz, 2013), corroborando que a inibição do produto foi importante no processo para maiores teores de sólidos iniciais.

Conforme mencionado anteriormente, no entanto, o modelo de Cao e De La Cruz não ajustou apropriadamente os dados experimentais do reator de coluna (Figura 3.9), sugerindo que outros fenômenos além da inibição enzimática poderiam afetar a hidrólise do polissacarídeo no reator. Assim, o modelo Chrastil foi testado porque considera efeitos difusionais que podem ser importantes no sistema reacional avaliado, principalmente em teor de sólidos mais elevados. O modelo Chrastil ajustou adequadamente os dados de glicose liberada durante a hidrólise em ambos os casos, tanto em frascos Erlenmeyer quanto no reator de coluna, com diferentes teores de sólidos (Figura 3.8).

Tabela 3.15 - Parâmetros obtidos utilizando os modelos Cao e De La Cruz e Chrastil para a hidrólise enzimática de glucana e da xilana em diferentes teores de sólidos iniciais em frascos Erlenmeyer e no reator de leito fixo preenchido com bagaço de cana pré-tratado. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.

Sistema	Teor de sólidos	Cao e De La Cruz		Chrastil		
		Parâmetros		Parâmetros		
		V_0	η	P_∞	K'	n
Frascos Erlenmeyer	2%	1,58 $\pm$ 0,01	0,198 $\pm$ 0,002	8,75 $\pm$ 0,40	0,02 $\pm$ 0,00	0,58 $\pm$ 0,05
	5%	7,92 $\pm$ 0,34	0,420 $\pm$ 0,002	19,14 $\pm$ 0,17	0,03 $\pm$ 0,00	0,80 $\pm$ 0,03
	7%	15,36 $\pm$ 1,85	0,614 $\pm$ 0,08	25,03 $\pm$ 0,93	0,042 $\pm$ 0,00	0,988 $\pm$ 0,13
Reator de coluna	9%	28,85 $\pm$ 3,86	0,842 $\pm$ 0,137	44,64 $\pm$ 2,05	2,7E ⁻² $\pm$ 7,84E ⁻⁴	0,275 $\pm$ 0,013
	12.5%	28,46 $\pm$ 1,79	0,692 $\pm$ 0,013	44,64 $\pm$ 2,58	1,1E ⁻³ $\pm$ 1,2 E ⁻⁴	0,336 $\pm$ 0,035
	16%	30,45 $\pm$ 5,89	0,789 $\pm$ 0,182	55,64 $\pm$ 7,82	1,6E ⁻⁴ $\pm$ 9,8E ⁻⁶	0,268 $\pm$ 0,026

Fonte: Próprio autor

Considerando os valores do parâmetro “n” (Tabela 3.15), os maiores teores de sólidos no reator de coluna resultaram em maior limitação difusional em comparação aos frascos Erlenmeyer. De fato, o modelo prediz que, se a resistência difusional for alta, n é pequeno ($<0,3$), se a resistência difusional for baixa, n é próximo de 1 (Chrastil, 1988). Como mostrado na Tabela 3.15, os valores de n foram menores para os experimentos realizados no reator de coluna (menor que 0,3 em todos os casos) em comparação aos realizados nos frascos Erlenmeyer. De qualquer forma, experimentos com altos teores de sólidos foram viáveis no reator da coluna, resultando em maiores concentrações de glicose e xilose no hidrolisado. Este resultado é atraente para biorrefinarias, uma vez que menos energia térmica seria necessária para as etapas de concentração do hidrolisado enzimático antes da fermentação dos açúcares monoméricos (MODENBACH; NOKES, 2013).

Assim, os hidrolisados produzidos no reator de leito fixo foram concentrados até atingir uma concentração de glicose de 100 g L^{-1} e utilizados em processos de fermentação para produzir etanol utilizando *S. cerevisiae* para experimentos com consumo de hexoses (C6) e também para cofermentação (C5/C6) usando *S. stipitis*.

3.3.6 Fermentação e cofermentação em reator de coluna de bolhas

A fermentação e cofermentação foram realizadas usando *Saccharomyces cerevisiae* IR2 e *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y7124, respectivamente. Para cada espécie de levedura, a influência da aeração (0,3 vvm, 0,5 vvm ou 0,7 vvm) no desempenho do processo foi avaliada. Como mostrado na Figura 3.10, a fermentação com *S. cerevisiae* atingiu maiores concentrações de etanol usando aeração de 0,5 e 0,7 vvm. Utilizando uma aeração de 0,7 vvm, a concentração de etanol obtida após 24 h foi de 32 g L^{-1} , correspondendo a um Y_p/s de $0,36 \text{ g.g}^{-1}$ (69% de eficiência) e um Q_p de $1,36 \text{ g L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Tabela 3.16).

Figura 3.10 - Concentração de substrato e produto na fermentação de hidrolisado enzimático usando *S. cerevisiae* IR2 em diferentes aerações em reator de colunas de bolhas: (a) 0,3 vvm; (b) 0,5 vvm; (c) 0,7 vvm. Condições: 30 ° C, concentração inicial de células 20 g L⁻¹.

Fonte: Próprio autor

Por outro lado, quando a aeração foi 0,5 vvm (Figura. 3.10b), uma maior concentração de etanol foi alcançada após 24 horas (38 g L^{-1}), correspondendo a um $Y_{p/s}$ de $0,40 \text{ g.g}^{-1}$ (79% de eficiência) e um Q_p de $1,58 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabela 3.16). A vazão de ar de 0,3 vvm resultou em um consumo lento de açúcar, atingindo $35,7 \text{ g L}^{-1}$ de etanol após 72 horas, correspondendo a um $Y_{p/s}$ de $0,33 \text{ g.g}^{-1}$ (65% de eficiência) e Q_p de $67 \text{ g L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Em todos os experimentos envolvendo *S. cerevisiae*, a concentração de xilose no meio foi de cerca de 50 g L^{-1} ao longo da fermentação e não foi consumida (Tabela 3.16). Além disso, foram obtidas baixas concentrações de glicerol (menor que de 1 g L^{-1}) em todos os experimentos. A biomassa final também foi medida, e as concentrações foram de 26,0, 25,5 e $30,1 \text{ g L}^{-1}$ nos experimentos utilizando-se vazões de aeração de 0,3, 0,5 e 0,7 vvm, respectivamente.

O comportamento observado pode ser explicado considerando a influência da disponibilidade de oxigênio para a levedura. Quando a aeração foi aumentada de 0,5 para 0,7 vvm, a redução na eficiência do etanol foi atribuída a uma alteração na via metabólica, da fermentativa para a respiratória. Nesse caso, quando havia mais oxigênio disponível, o metabolismo celular foi direcionado para a produção de biomassa, e não para a produção de etanol.

De fato, Deesuth et al. (2015) relataram a produção de etanol a partir de sorgo sacarino por *S. cerevisiae* sob diferentes condições de aeração a 30°C em modo de batelada em um balão de ar de 500 mL e em um fermentador de 2 L. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que a concentração de etanol aumentou com um aumento na taxa de aeração até um ponto específico, além do qual a concentração de etanol decresceu quando maiores taxas de aeração foram usadas. No presente trabalho, a redução na aeração de 0,5 vvm para 0,3 vvm mostrou-se desfavorável para o processo. Neste caso, o consumo de açúcar e a produção de álcool foram mais lentos e esse fato pode estar relacionado à baixa homogeneização do meio no processo envolvendo leveduras flocculantes, considerando que a aeração também foi responsável pela mistura no reator de colunas de bolhas. Os resultados do processo de co-fermentação usando *S. stipitis* são mostrados na Figura. 3.11 e na Tabela 3.16. Como pode ser visto na Tabela 16, a glicose foi consumida completamente quando se utilizou a aeração de 0,5 e 0,7 vvm. Quando a taxa de aeração foi de 0,3 vvm, apenas 63,1% da glicose inicialmente presente no meio foi consumida após 48 h. A xilose foi consumida apenas em menor escala, com o maior consumo observado sob a taxa de aeração de 0,5 vvm. De fato, embora esta levedura metabolize glicose e xilose, o consumo de pentoses é relativamente lento.

Tabela 3.16 - Parâmetros e resultados para fermentação e cofermentação realizados no reator de colunas de bolhas usando diferentes fluxos de aeração. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Parametros	Fermentação usando			Cofermentação usando		
	<i>S. cerevisiae</i> (24 h)			<i>S. stipitis</i> (48 h)		
	Aeração					
	0,3	0,5	0,7	0,3	0,5	0,7
Consumo de glicose	65,3 ± 2,6	96,1 ± 5,3	94,7 ± 2,4	63,1 ± 1,1	98 ± 2,2	99,7 ±0,7
Consumo de xilose	0	0	0	10,3 ± 3,2	18,8 ± 3,5	16,6 ± 4,8
Y _{p/s} (g g ⁻¹)*	0,34 ±0,01	0,40±0,02	0,36 ±0,01	0,29±0,01	0,31±0,01	0,31±0,01
Eficiência (%)**	67,4 ± 2,7	79,0 ± 3,1	69,8 ± 2,1	57,6±1,7	61,1 ± 2,1	62,3 ± 2,0
Qp (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)* ** *	0,94±0,02	1,58±0,04	1,36±0,03	0,35±0,01	0,64±0,015	0,63±0,018
X _{final} ****	26,0 ± 2,1	25,5± 2,7	33,7± 2,9	31,8± 1,8	42,5± 3,1	43,8± 3,4
pH _{final}	4,5± 0,2	4,3± 0,4	4,0± 0,4	4,3± 0,4	4,5± 0,2	4,1± 0,12

Rendimento do produto com base no consumo de substrato (consumo de glicose para experimentos com *S. cerevisiae* e a soma dos consumos de glicose e xilose para experimentos com *S. stipitis*)

** Calculado considerando 0,51 g g⁻¹ como o rendimento teórico

*** Produtividade volumétrica de etanol

**** Concentração final de biomassa

Fonte: Próprio autor

Figura 3.11 - Concentração de substrato e produto na cofermentação de hidrolisado enzimático usando *S. stipitis* em diferentes taxas de aeração em reator de colunas de bolhas: (a) 0,3 vvm; (b) 0,5 vvm; (c) 0,7 vvm. Condições: 30 ° C, concentração inicial de células 20 g L⁻¹.

Fonte: próprio autor

Nos experimentos de cofermentação a produção de etanol foi maior quando foram utilizadas taxas de aeração mais altas. A taxa de aeração de 0,3 vvm resultou em 16 g L⁻¹ de etanol após 48 h, correspondendo a uma eficiência de 58%, Y_{p/s} de 0,29 g.g⁻¹ e Q_p de 0,35 g L⁻¹h⁻¹. A concentração de etanol atingiu aproximadamente 30 g L⁻¹ em 48 h utilizando a aeração de 0,5 e 0,7 vvm. A biomassa final também foi medida para todos os experimentos, obtendo-se 33,0, 37,2 e 43,4 g L⁻¹ nos experimentos com a aeração de 0,3, 0,5 e 0,7 vvm, respectivamente, mostrando efeito benéfico da aeração no crescimento celular.

A levedura *S. stipitis* passou a consumir xilose apenas após o consumo de glicose, exibindo comportamento de diauxia. No entanto, após 48 h de fermentação, apenas cerca de 15-20% da xilose inicial foi consumida usando as maiores taxas de aeração.

Assim, procedeu-se a experimentos subsequentes em batelada repetida, os quais foram realizados durante um período de tempo de 96 horas. O consumo lento de xilose por *S. stipitis* também foi relatado por Gutierrez-Rivera et al. (2011). Esses autores estudaram o processo usando um fermentador de 3 L carregado para 1,5 L de volume de trabalho usando uma taxa de fluxo de ar de 0,6 vvm e um meio contendo glicose e xilose inicial de 75 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹, respectivamente. Nesse trabalho, a mistura glicose/xilose foi completamente consumida após 200 h, sendo que a glicose foi completamente consumida em 72 h, e o consumo de xilose ocorreu nas 128 horas após a exaustão da glicose. A concentração de etanol atingiu 34,35 g L⁻¹, e a produção máxima de etanol com base na quantidade de glicose/xilose consumida foi de 0,46 g.g⁻¹.

3.3.7 Fermentação e cofermentação com o reciclo de células

3.3.7.1 Fermentação

Com base nos resultados anteriores, o melhor desempenho foi obtido na aeração de 0,5 vvm para ambas as leveduras avaliadas. Posteriormente, considerando o reciclo celular favorável pelo uso da cepa floculante *S. cerevisiae* IR2 e a possibilidade de melhorar o desempenho da fermentação via adaptação celular, foram realizados experimentos em bateladas repetidas. Essa abordagem é economicamente competitiva devido à sua simplicidade e baixo custo (SANTOS et al., 2015).

A fermentação alcoólica usando cepas de levedura floculante resulta em uma maior concentração de biomassa no biorreator, em comparação com os processos que utilizam culturas sem capacidade de floculação. Além disso, as leveduras floculantes favorecem a operação do reciclo celular, pois os pellets celulares podem ser decantados, evitando a necessidade da etapa de centrifugação.

Os resultados de fermentação com reciclo de células com *S. cerevisiae* são mostrados na Figura 3.12 e na Tabela 3.17.

Figura 3.12 - Concentração de glicose e etanol durante a fermentação com reciclo de células usando *S. cerevisiae* na aeração de 0,5 vvm no reator de coluna de bolhas

Fonte: Próprio autor

Tabela 3.17 - Resultados de bateladas repetidas de fermentação com reciclo de células realizado no reator de coluna de bolhas utilizando *S. cerevisiae*. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Batelada	Concentração final de etanol (g/L)	$Y_{p/s}^*$ (g g ⁻¹)	Eficiência de fermentação** (%)	Produtividade volumétrica (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	37,8 $\pm$ 2,5	0,41 $\pm$ 0,020	80,1 $\pm$ 3,2	1,57 $\pm$ 0,018
2	38,9 $\pm$ 1,3	0,38 $\pm$ 0,017	75,1 $\pm$ 2,7	1,21 $\pm$ 0,012
3	36,5 $\pm$ 2,7	0,40 $\pm$ 0,014	78,8 $\pm$ 3,1	1,13 $\pm$ 0,014
4	35,6 $\pm$ 3,1	0,43 $\pm$ 0,022	84,1 $\pm$ 3,9	1,10 $\pm$ 0,012
5	39,6 $\pm$ 1,2	0,46 $\pm$ 0,021	90,8 $\pm$ 6,2	1,24 $\pm$ 0,011
6	39,5 $\pm$ 0,8	0,44 $\pm$ 0,019	85,2 $\pm$ 5,2	1,23 $\pm$ 0,010
Média	38,0 $\pm$ 1,9	0,42 $\pm$ 0,015	82,4 $\pm$ 4,1	1,25 $\pm$ 0,027

*Rendimento de produto baseado no consume de glicose

**Calculado considerando o rendimento teórico de 0.51 g.g⁻¹

Fonte: Próprio autor

No final das bateladas observou-se concentração de etanol de 37 a 40 g L⁻¹, correspondendo a 80,0 a 85,2% de eficiência de fermentação e produtividade volumétrica de 1,23 a 1,57 (g L⁻¹ h⁻¹). Após 5 reciclos de célula, a concentração final de biomassa foi de 45,7 g L⁻¹, enquanto a concentração inicial de células foi de 20 g L⁻¹. Em média, os resultados de fermentações com reciclo de células (Tabela 3.17) foram similares àqueles das fermentações em batelada simples para a aeração de 0,5 vvm (Tabela 3.16), embora a eficiência de fermentação tenha sido ligeiramente maior e a produtividade volumétrica 20% menor. Uma possível explicação para esse comportamento é um aumento na concentração de células entre lotes sucessivos, o que pode favorecer a produção de etanol devido à menor disponibilidade de oxigênio por unidade de biomassa. No entanto, maiores concentrações de células também podem resultar em limitações de transferência de massa no reator e, assim, diminuir a produtividade.

3.3.7.1 Cofermentação

A estratégia de cofermentação com reciclo de células também foi avaliada com a levedura *S. stipitis*. Os resultados são mostrados na Tabela 3.18 e na Figura 3.13. As cofermentações em bateladas repetidas com *S. stipitis* alcançaram concentrações finais de etanol entre 33,5 e 38,4 g L⁻¹, correspondendo a eficiências de fermentação entre 46 e 55,2% (Tabela 3.18). Com o prolongamento do tempo da reação de cofermentação para 96 horas, toda a xilose foi consumida no processo, exibindo também um comportamento de diauxia (Figura 3.13). A concentração final de biomassa após os reciclos foi de 44,5 g L⁻¹.

A estratégia do reciclo de células mostrou-se eficaz em aumentar o consumo de xilose por *S. stipitis*, com consumo variando de 90,1% a 98,0% entre a primeira e a quarta batelada. Além disso, a concentração de etanol, a eficiência de fermentação e a produtividade volumétrica também aumentaram no decorrer dos reciclos.

Outros metabólitos, como glicerol, xilitol ou ácido acético, foram produzidos durante a cofermentação, mas em baixa concentração (<1 g L⁻¹). O aumento do consumo de xilose após o consumo de glicose não resultou em um aumento significativo na concentração de etanol (Figura 3.13), o que pode estar relacionado à produção de biomassa pelas pentoses. Este comportamento está ligado à disponibilidade de oxigênio para as células durante o processo.

A aeração escolhida foi de 0,5 vvm, a qual foi selecionada baseada nos experimentos em batelada simples, nos quais a xilose não foi consumida devido ao tempo de fermentação insuficiente (secção 3.3.6).

Figura 3.13 - Concentração de glicose, xilose e etanol durante a cofermentação com reciclo de células utilizando *S. stipitis* e aeração de 0,5 vvm em reator de coluna de bolhas.

Fonte: Próprio autor

Tabela 3.18 - Resultados de experimentos de cofermentação em bateladas reptidas com reciclo de células realizadas no reator de coluna de bolhas utilizando *S. stipitis*. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Experimento	Consumo de xilose (%)	concentração final de etanol (g/L)	$Y_{p/s}^*$ ($g\ g^{-1}$)	Eficiência de fermentação ** (%)	Produtividade volumétrica ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
1	90,6 $\pm$ 2,5	33,5 $\pm$ 1,8	0,23 $\pm$ 0,01	46,0 $\pm$ 2,5	0,35 $\pm$ 0,01
2	93,5 $\pm$ 3,8	34,5 $\pm$ 2,5	0,24 $\pm$ 0,01	47,4 $\pm$ 2,2	0,36 $\pm$ 0,011
3	93,5 $\pm$ 3,1	37,2 $\pm$ 1,3	0,25 $\pm$ 0,015	50,4 $\pm$ 3,1	0,39 $\pm$,001
4	97,2 $\pm$ 1,2	38,4 $\pm$ 2,9	0,28 $\pm$ 0,014	55,2 $\pm$ 3,7	0,40 $\pm$ 0,01
Média	93,7 $\pm$ 2,6	35,9 $\pm$ 2,2	0,25 $\pm$ 0,012	49,8 $\pm$ 2,8	0,38 $\pm$ 0,01

** Rendimento de produto baseado no consumo de glicose e xilose

** Calculado considerando o rendimento teórico de 0.51 $g.g^{-1}$

Fonte: próprio autor

A xilose foi consumida com o maior tempo de cofermentação usado nas bateladas repetidas, mas a aeração provavelmente não foi adequada para suportar a produção de etanol a partir deste substrato nos estágios finais da fermentação.

Um crescimento respiro-fermentativo de *S. stipitis* (anteriormente chamado de *Pichia stipitis*) foi relatado por Klinner et al. (2005), autores os quais também observaram que o consumo de açúcar e a formação de etanol diminuíram no último reciclo de células quando se utilizou glicose como substrato. Os autores concluíram que não estava claro se esse comportamento era devido ao efeito da concentração de oxigênio (que era baixa nesse caso) ou devido ao alcance de limite na concentração de etanol inibitória.

Em outro trabalho, Bellido et al. (2013) avaliaram a produção de etanol por *Pichia stipitis* sob diferentes taxas de aeração utilizando um meio composto de uma mistura de glicose e xilose. Nesse trabalho, o uso de uma menor taxa de aeração resultou em maior produção de etanol, enquanto um aumento na taxa de aeração direcionou o metabolismo para o crescimento celular em vez da produção de etanol. No mesmo trabalho, quando foram utilizadas taxas intermediárias de aeração, o etanol foi produzido rapidamente durante as primeiras horas de fermentação, mas não de forma significativa após a exaustão da glicose, apesar de toda a xilose presente no meio ter sido consumida. O consumo de etanol foi ainda observado em taxas de aeração mais altas. Este potencial para o consumo parcial de etanol pela levedura, mesmo na presença de xilose, como previamente observado por Silva et al. (2012) para maiores taxas de aeração, poderia explicar parcialmente nossos resultados.

A cofermentação de açúcares C6 e C5 usando *S. stipitis* não foi benéfica para o desempenho do processo, como indicado pela menor eficiência de fermentação ou produtividade observada em comparação com a obtida com a fermentação de glicose por *S. cerevisiae*. De fato, para observar o consumo de xilose e aumentar a produção de etanol, foi necessário um tempo maior de processo usando *S. stipitis*. No entanto, a utilização de xilose para produzir etanol, ou mesmo outro produto de valor agregado, foi demonstrada como necessária para a viabilidade econômica de biorrefinarias (MENDES et al., 2018). Assim, considerando os resultados obtidos, estudos futuros incluindo mudanças na taxa de aeração ou controle de oxigênio dissolvido durante a fermentação são interessantes para melhorar a produção de etanol através desse processo.

3.4 Conclusão

- ✓ A amostra de bagaço de cana-de-açúcar selecionada para uso no presente projeto apresentou, após moagem em moinho de martelo, mais de 50% das partículas com tamanho médio menor que 2,08 mm, o que favoreceu o desenvolvimento do trabalho por significar maior uniformidade de tamanho em relação ao bagaço não moído e maior área superficial para atuação dos agentes de pré-tratamento e hidrólise;
- ✓ O bagaço moído foi caracterizado quimicamente, apresentando composição dentro da faixa de valores encontrados na literatura, com mais de 65% (em massa) de polissacarídeos (41,4% de glucana e 19,7% de xilana);
- ✓ Após pré-tratamento sulfito alcalino, a análise composicional indicou enriquecimento em glucana e diminuição no teor de lignina, indicando que o pré-tratamento foi realizado de forma a favorecer a hidrólise enzimática da celulose do material;
- ✓ Experimentos iniciais realizados em frascos Erlenmeyer indicaram a utilização de 16,4 FPU de preparação comercial de celulasas e 4,4 U/g de β -glicosidase por grama de bagaço pré-tratado, resultando em hidrólise de $77,83 \pm 1,69\%$ da celulose presente no material;
- ✓ A realização da hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado em reator de coluna na vazão de 22,7 mL/min e 12,5 % de sólidos resultou na hidrólise de 81,15% da celulose presente no material e 73,7% da xilana;
- ✓ A variável razão mássica sólido/líquido no reator apresentou influência linear significativa e positiva para a resposta concentração de glicose no hidrolisado e negativa para a hidrólise enzimática da celulose;
- ✓ Foi possível a composição de um modelo quadrático para expressar a concentração de xilose no hidrolisado em função das variáveis razão mássica sólido/líquido e vazão de recirculação no reator, A otimização feita para esta variável resposta indicou o uso das seguintes condições: razão sólido/líquido de 14% e vazão de recirculação de 22,7 mL/min, sendo que o modelo previa, nestas condições, a obtenção de 28 g/L de xilose, o que foi confirmado experimentalmente;
- ✓ Nos experimentos realizados para investigação mais detalhada do efeito do carregamento de sólidos no desempenho da hidrólise enzimática, esta, quando realizada em reator de coluna, resultou em alta digestibilidade de glucana com menor carga inicial de sólidos (9%), enquanto o uso de uma carga sólida de 16% resultou em maiores concentrações de açúcar no hidrolisado;

- ✓ Os modelos matemáticos usados indicaram quais são as variáveis que mais influenciam no processo de hidrólise enzimática;
- ✓ O modelo Chrastil ajustou adequadamente os dados de glicose liberada durante a hidrólise em ambos os casos, ou seja, tanto em frascos Erlenmeyer quanto no reator de coluna, com diferentes teores de sólidos;
- ✓ Os processos de fermentação e cofermentação avaliados exibiram melhor desempenho com taxa de aeração de 0,5 vvm em um reator de colunas de bolhas;
- ✓ Fermentações com reciclo de células apresentaram desempenho semelhante às realizadas em bateladas simples com a levedura *S. cerevisiae*. Quando a levedura *S. stipitis* foi utilizada nas cofermentações com reciclo de células, o consumo de xilose, a concentração de etanol, a eficiência de fermentação e a produtividade volumétrica aumentaram ao longo dos ciclos;
- ✓ A fermentação de C6 por *S. cerevisiae* resultou em melhor desempenho no processo em comparação com a cofermentação de açúcares C5C6 por *S. stipitis*, destacando a necessidade de outras estratégias para melhorar esta opção e permitir a utilização da xilose para a produção de etanol;
- ✓ Os reatores de coluna mostraram-se promissores, versáteis e simples para uso em processos biológicos em biorrefinarias.

Referências

- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**. v. 29, p. 675–685, 2011.
- ANTUNES, F. A. F.; SANTOS, J. C.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; PERES, G. F. D.; SILVA, S. S. Hemicellulosic ethanol production by immobilized wild brazilian yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Effects of cell concentration and stirring rate. **Current Microbiology**, v.72, p.133-138. 2016.
- BAILEY, M. J.; BIEL, Y. P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23 p. 257–270, 1992.
- BELLIDO, C.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, T. M. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v.133, p.151-158. 2013.

BIDEAUX, C.; MONTHEARD, J.; CAMELEYRE, X.; MOLINA-LOUVE, C.; ALFENORE, F. Metabolic flux analysis model for optimizing xylose conversion into ethanol by the natural C5-fermenting yeast *Candida shehatae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.100, p.1489-1499, 2016.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4862-4874, 2009.

BORREGA, M.; SIXTA, H. 2015. Water prehydrolysis of birch wood chips and meal in batch and flow-through systems: a comparative evaluation. **Industrial Engineering Chemical Research**, 54, 6075–6084.

CAO, W.; DE LA CRUZ, E. M. Quantitative full time course analysis of nonlinear enzyme cycling kinetics. **Scientific Resource**, v.3, p. 2658, 2013.

CHRASTIL, J. Enzymic product formation curves with the normal or diffusion limited reaction mechanism and in the presence of substrate receptors. **International Journal of Biochemistry**, v.20, p.683–693, 1988.

DEESUTH, O.; LAOPAIBOON, P.; KLANRIT, P.; LAOPAIBOON, L. Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under high gravity and very high gravity conditions: Effects of nutrient supplementation and aeration. **Industrial Crop and Products**, v. 74, p. 95-102. 2015.

FERRAZ, A.; BAEZA, J.; RODRIGUEZ, J.; FREER, J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, p. 201-212, 2000.

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

GAN, Q.; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. **Process Biochemistry**, v. 38, p.1003–1018, 2003.

GAURAV, N.; SIVASANKARIB, S.; KIRANC, G, S.; NINAWEA, A.; SELVINB, J. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: a Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 205-214, 2017.

GUTIERREZ-RIVERA, B.; WALISZEWSKI-KUBIAK, K.; CARVAJAL-ZARRABAL, O.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Conversion efficiency of glucose/xylose mixtures for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV01 and *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. 2011. **Wiley Online Library** Acesso em: 10 ago. 2019.

HEMSWORTH, G. R.; HENRISSAT, B.; DAVIES G. J.; WALTON P. H. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide. **Nature Chemical Biology**, v.10, p.122–126, 2014.

KLINNER, U.; FLUTHGRAF, S.; FREESE, S.; PASSOTH, V. Aerobic induction of respiro-fermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, p. 67, v. 247–253, 2005.

LAURITO-FRIEND, D.F.; MENDES, F.M.; REINOSO, F.M.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Sugarcane hybrids with original lowlignin contents and high field productivity are useful to reach high glucose yields from bagasse. **Biomass Bioenergy**, v. 75, p. 65–74, 2015.

MATTEI, L. Programa Nacional para Produção e Uso do Biodiesel no Brasil (PNPB): trajetória, situação atual e desafios. **Revista econômica do Nordeste**, v. 41, p. 731–740, 2017.

MENDES, F. M.; HEIKKILÄ, E.; FONSECA, M. B.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A.; FARDIM, P. Topochemical characterization of sugar cane pretreated with alkaline sulfite. **Industrial Crop and Products**, v. 69, p. 60–67, 2015.

MENDES, F. M.; VASCONCELOS, M. H.; DIAS, M.O.S.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F.; SANTOS, J.C.; JESUS, C. D. F.; WATANABE, M. D. B.; JUNQUEIRA, T. L.; BONOMI, A. Alkaline sulfite pretreatment for integrated first and second generation ethanol production: A techno-economic assessment of sugarcane hybrids. **Biomass & Bioenergy**, v. 119, p. 314–321, 2018.

MCNEIL, B.; HARVEY, L. H. (Ed.). **Practical Fermentation Technology**. Chichester: John Wiley, 2008. p. 388.

MODENBACH, A.; NOKES, S. E. The Use of High-Solids Loadings in Biomass Pretreatment—A Review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 1430–1443, 2013.

PINO M. S.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; MICHELIN, M.; FLORES-GALLEGOS, A. C.; MORALES-RODRIGUEZ, R.; TEIXEIRA, J. A.; RUIZA, H. A. Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. **Chemical Engineering Journal**, p. 119–136, 2018.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 511–525, 2015.

PRATTO, B.; DE SOUZA, R. B. A.; SOUSA JR, R.; DA CRUZ, A. J. G. Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Straw: Kinetic Study and Semi-Mechanistic Modeling. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 178, p. 1430–1444, 2016.

SANTOS, L. D.; SOUSA, M. D. B.; GUIDINI, C. L.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Continuous ethanol fermentation in tower reactors with cell recycling using flocculent *Saccharomyces cerevisiae*, **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1725–1729, 2015.

SANTOS, L. V.; DE BARROS GRASSI, M. C.; GALLARDO, J. C. M.; PIROLLA, R. A. S.; CALDERÓN, L. L.; DE CARVALHO-NETTO, O. V.; PEREIRA, G. A. G. Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. **Industrial Biotechnology**, v. 12, p. 40–57, 2016.

SIGMA-ALDRICH, 2016 Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/cellulasefromtrichodermaeeseiatcc2692112345901254811?lang=pt®ion=BR>. Acesso em: 24 abr. 2018.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, INÊS C.; TEIXEIRA. JOSÉ, A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v.37, p. 259-265, 2012.

SILVA, V. S.; GARCIA, C. A.; SILVA, C. M. O. Destino do bagaço da cana-de-açúcar: um estudo a partir das agroindústrias sucroalcooleiras do Paraná, **Rama**, v. 3, p. 59-76, 2010.

SIQUEIRA. G.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Limitation of cellulose accessibility and unproductive binding of cellulases by pretreated sugarcane bagasse lignin. **Biotechnology Biofuels**, v.10, p. 1-12, 2017.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R. O.; SCARLATA, C, SLUITER, J. TEMPLETON, D.; ENERGY, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure**, p.1-14. 2012.

TETE, M. F. **Vínculos entre instituições e funções na formação de um sistema tecnológico de inovação: o caso do etanol de segunda geração brasileiro**. 2016. (Tese de doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

TRAVAINI, R. et al. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 332–339, 2013.

YANG, B.; WILLIES, D. M.; WYMAN, C. E. Changes in the Enzymatic Hydrolysis Rate of Avicel Cellulose With Conversion. **Biotechnology Bioengineering**, v. 94 p. 1123-1128, 2006.

YU, Z. et al. The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 9083–9, 2011.

ZHANG, X. et al. High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5890–7, 2009.

4 HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO/COFERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS (SSF/SSCF) EMPREGANDO LEVEDURAS ACLIMATIZADAS E BIORREATORES DE COLUNA

RESUMO

Sistemas de sacarificação e fermentação ou cofermentação simultâneas (SSF/SSCF) apresentam vantagens para uso em biorrefinarias, como a intensificação do processo pela realização de diferentes etapas em um mesmo reator e a mitigação de problemas de inibição das enzimas por produtos de hidrólise. Sua utilização, no entanto, usualmente requer a seleção de linhagens de leveduras capazes de fermentar açúcares obtidos de materiais lignocelulósicos em temperaturas acima de 35°C. Neste trabalho, avaliou-se a influência da aeração em processos SSF/SSCF em reatores de coluna para a produção de etanol de segunda geração utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por sulfito alcalino e leveduras aclimatizadas. Na primeira etapa do trabalho, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* IR2 e *Sheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124, foram submetidas a processo de aclimatização progressiva. Em seguida, procedeu-se à produção de etanol nas configurações SSF e SSCF a 40 °C em frascos Erlenmeyer, sendo empregados frascos Erlenmeyer e biorreatores de coluna. O meio de fermentação foi composto por bagaço pré-tratado, solução de celulasas, leveduras aclimatizadas e nutrientes. Os processos de fermentação e co-fermentação em frascos Erlenmeyer resultaram em 15 g L⁻¹ de etanol em 48 horas para o sistema SSF com *S. cerevisiae* e 17 g L⁻¹ de etanol em 72 horas para o sistema SSCF empregando *S. stipitis*, correspondendo a fator de rendimento de 0,62 g/g e 0,77 g/g, respectivamente. A avaliação da aeração nos processos fermentativos em reator foi realizada em três diferentes vazões de ar: 0,3 vvm, 0,5 vvm e 0,7 vvm. Neste caso, as máximas concentrações de etanol obtidas foram 18 g L⁻¹ e 16 g L⁻¹, respectivamente, empregando as leveduras *S. cerevisiae* e *S. stipitis*, em 72h de processo com aeração de 0,5 vvm. O sistema apresentou potencial para aplicação em biorrefinarias, sendo necessários mais estudos visando à otimização do processo e, consequentemente, aumento na concentração final de produto.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Aclimatização de microrganismos. Etanol de segunda geração. Sacarificação e fermentação simultânea. Biorrefinaria de cana-de-açúcar.

4.1 Introdução

Nos últimos anos, diversas preocupações referentes a aspectos econômicos, ambientais e de segurança energética têm motivado o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa visando-se à obtenção de combustíveis alternativos de fontes renováveis. Dentre as opções disponíveis, destaque pode ser dado ao etanol de segunda geração (CHERUBINI, 2010; BOUDET, 2011). Este, que é obtido a partir de materiais lignocelulósicos, apresenta vantagens como a elevada disponibilidade de biomassa no planeta, o elevado potencial de redução na emissão de CO₂ quando se considera o balanço global de carbono e o fato de sua obtenção não implicar na competição com a cadeia de produção de alimentos (BNDES; CGEE, 2008; GONZALEZ et al., 2012). Materiais lignocelulósicos é matéria-prima renovável mais abundante no planeta, sendo este tipo de material a base para a produção de etanol, biopolímeros, ácidos orgânicos e uma diversa gama de outros produtos (SANTOS et al., 2005; GHATAK, 2011; TERÁN HILARES et al., 2017a).

O etanol obtido a partir de materiais lignocelulósicos, também conhecido como etanol de segunda geração (2G), tem tido grande destaque por razões econômicas, sociais e ambientais (MATTEI, 2017). Nos últimos anos, têm ocorrido esforços para viabilizar biorrefinarias de produção de etanol 2G e outros compostos a partir de materiais lignocelulósicos (SILVA et al., 2012; TETE, 2016). Todavia, ainda há diversos gargalos no processo a serem superados.

A tecnologia em desenvolvimento para produção de etanol de segunda geração inclui uma etapa (em geral química) de pré-tratamento do material, a qual tem por objetivo aumentar a digestibilidade enzimática da celulose presente. Existem várias formas de pré-tratamento empregados, como explosão a vapor, ultrassom, cavitação hidrodinâmica e inúmeros outros; porém, neste trabalho utilizou-se um pré-tratamento sulfito alcalino baseado em processo utilizado na indústria de papel e celulose. Este pré-tratamento apresenta como vantagens a a sulfonação da molécula de lignina, o que ocasiona um aumento da retenção de água da fibra e melhora a dissolução desta fração polifenólica (MENDES et al., 2015). As presenças destes grupos funcionais carregados negativamente na lignina residual mitigam o efeito da adsorção improdutivo de celulasas na superfície do material pré-tratado, sendo que isso resulta em um melhor rendimento de hidrólise enzimática (MENDES et al., 2015; SIQUEIRA et al., 2017).

As outras etapas para obtenção do etanol incluem a hidrólise enzimática e a fermentação, e em alguns casos cofermentação, quando pentoses são convertidas a etanol juntamente com as hexoses. Visando-se à aplicação industrial, é importante que estas etapas

sejam estudadas em biorreatores susceptíveis de ampliação de escala. Neste caso, biorreatores de coluna são de grande interesse devido a vantagens como facilidade de construção e de operação do sistema e a possibilidade de utilizar elevado carregamento de sólidos (ANTUNES et al., 2017; MODENBACH; NOKES, 2012; POPPE et al., 2015).

Durante estas etapas biológicas de hidrólise enzimática e fermentação, há diferentes configurações dos sistemas passíveis de serem empregadas, podendo-se realizar ambas as etapas em separado – processo SHF (*separate hydrolysis and fermentation*) ou de forma simultânea – “sacarificação e fermentação simultânea”, SSF (*simultaneous saccharification and fermentation*), o que é chamado, quando inclui a cofermentação de pentoses e hexoses, pode resultar em processos em separado - SHCF (*separate hydrolysis and cofermentation*) ou em simultâneo - “sacarificação e cofermentação simultânea”, SSCF (*simultaneous saccharification and cofermentation*). Pode-se até mesmo empregar microrganismos que produzam as enzimas hidrolíticas e fermentem o hidrolisado a etanol nos chamados bioprocessos consolidados (BRETHAUER; WYMAN, 2009).

Há ainda variações destas configurações básicas de processo. Uma variação da configuração SSF de produção de etanol de segunda geração é a hidrólise e fermentação semissimultânea (SSSF), na qual se inicia apenas com a hidrólise enzimática em suas condições ótimas, sendo a temperatura reduzida após um tempo de hidrólise com concomitante inoculação do microrganismo, seguindo-se o processo em simultâneo em condições mais favoráveis à fermentação (ELLISTON et al., 2013).

A vantagem das configurações de processo SSF e SSCF está relacionada ao fato da hidrólise da celulose ser inibida por produtos (CHOUDHARY et al., 2016) e, desta forma, a transformação simultânea da glicose em etanol pode favorecer a produtividade e rendimento da etapa enzimática (VAN ZYL et al., 2011; ASK et al., 2012). A hidrólise enzimática e fermentação ou cofermentação simultânea, no entanto, apresenta limitações com relação às condições do processo, uma vez que as celulasas atuam em uma faixa de temperatura mais elevada em comparação às leveduras empregadas. Diferentes alternativas têm sido avaliadas e, no presente trabalho, leveduras foram aclimatizadas para condução do processo a 40°C, conforme metodologia descrita por Edgardo et al. (2008). Sabe-se que a condição de estresse do microrganismo devido à exposição progressiva a elevadas temperaturas pode causar mudanças estruturais e/ou mudanças metabólicas que atuam como ativador da expressão de genes envolvidos na síntese de compostos específicos que protegem o microrganismo, aumentando sua resistência e favorecendo a fermentação em temperatura elevada

(EDGARDO et al., 2008). Avaliou-se também, no presente trabalho, o potencial de uso de reator de coluna de bolhas para o processo, sendo empregadas diferentes condições de aeração. Bagaço pré-tratado por sulfito alcalino foi empregado como matéria-prima e processos SSF com *Saccharomyces cerevisiae* IR2 e SSCF com *Sheffersomyces stipitis* foram conduzidos em frascos Erlenmeyer e no reator. O bagaço de cana-de-açúcar foi selecionado como matéria-prima em função de sua grande disponibilidade no Brasil, por ser subproduto da indústria sucroalcooleira (AMAYA-DELGADO et al., 2018).

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi gentilmente doado pela Usina Ipiranga Agroindustrial – Unidade Descalvado, localizada no município de Descalvado/SP. O bagaço foi seco por exposição à luz solar e em seguida triturado em moinho de martelo, sendo classificado em peneiras padrão série Tyler, empregando-se nos experimentos a fração que passou por uma malha de 200 mesh. Amostras do bagaço moído e classificado foram analisadas com relação a sua composição em termos de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas.

4.2.2 Pré-tratamento sulfito alcalino

Para o pré-tratamento utilizou-se um reator de coluna com 460 mm de altura e 220 mm de diâmetro interno, segundo a metodologia estabelecida por Mendes et al. (2015). O bagaço foi desaerado por 30 minutos utilizando uma bomba de vácuo, sendo posteriormente levado para o interior do biorreator com uma quantidade de 600g de bagaço (massa seca) e com 6L da solução de sulfito alcalino $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{NaOH}$ empregando-se a proporção de 10% m/m e 5% m/m de cada reagente, respectivamente, em relação à massa seca de biomassa. O bagaço foi novamente desaerado dentro do reator por 15 minutos e levado para a autoclave. O processo de cozimento foi realizado por 2h a uma temperatura de 121°C e pressão de 1 atm. Após esse período, o bagaço pré-tratado foi separado do meio líquido por filtração e lavado com água de destilada. Este procedimento foi realizado até que a água de lavagem atingisse pH=7. Posteriormente, o bagaço pré-tratado foi caracterizado com relação aos seus componentes principais (celulose, hemicelulose e lignina).

4.2.3 Aclimatização dos microrganismos

Os microrganismos utilizados foram *Saccharomyces cerevisiae* IR2 (para processos SSF), uma levedura floculante, e *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124 (para processos SSCF), ambos disponíveis no LOT/EEL/USP e armazenados em Ágar extrato de malte a 4°C. Para aclimatização, as leveduras foram submetidas a uma elevação gradual de temperatura (aclimatização progressiva) para seu uso em processos fermentativos a 40°C, conforme metodologia adaptada de Edgardo et al. (2008). Inicialmente, as leveduras foram incubadas em incubadora orbital a 150 rpm e 36°C, em frascos Erlenmeyer de 250mL carregados com 100mL de meio contendo 50g/L de glicose (para *S. cerevisiae*) ou xilose (para *S. stipitis*), 5g/L de extrato de levedura, 1g/L de KH_2PO_4 , 0,3g/L de NH_4Cl e 2g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Durante a etapa de aclimatização, a cada 24 horas as leveduras eram centrifugadas a 2000 g por 15 min e transferidas para novo meio de cultivo com a mesma composição. Nesta etapa, a temperatura era aumentada em 1°C nos quatro primeiros dias, até atingir 40°C, sendo a partir de então elevada 0,5°C a cada 12 horas por mais dois dias, atingindo 42°C. Posteriormente, as células foram recuperadas por centrifugação a 2000g por 15 min, lavadas e ressuspensas em água destilada para obtenção de uma suspensão com elevada densidade celular, sendo os microrganismos transferidos para placas de Petri com meio YMA (20g/L de Ágar, 10g/L de glicose, 3g/L de extrato de malte, 3g/L de extrato de levedura e 5g/L peptona). As placas foram incubadas em três diferentes temperaturas, 37°C, 40°C e 42 °C sendo mantidas 72h em cada uma destas temperaturas.

4.2.4 Preparo do Inóculo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* IR2 aclimatizada foi incubada em agitador rotativo por 24 h a 40°C e 150 rpm, sendo utilizados frascos Erlenmeyer de 500mL com 200mL de meio de cultura contendo 50g/L de glicose, 5g/L de extrato de levedura, 1g/L de KH_2PO_4 , 0,3g/L de NH_4Cl e 2g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O cultivo do microrganismo *Scheffersomyces stipitis* aclimatizado, por sua vez, foi realizado em agitador rotativo por 48 h a 40°C e 200 rpm, utilizando-se frascos Erlenmeyer de 500mL com 200mL de meio de cultura contendo 50g/L de xilose, 5g/L de extrato de levedura, 1g/L de KH_2PO_4 , 0,3g/L de NH_4Cl e 2g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Para ambos os microrganismos, as células foram recuperadas por centrifugação a 2000g por 15 min, lavadas e ressuspensas em água destilada para

obtenção da suspensão celular que foi utilizada nas fermentações em quantidade adequada para concentração inicial de biomassa de 1 g/L.

4.2.5 Avaliação de sistemas SSF e SSCF em frascos Erlenmeyer

O processo SSF ou SSCF foi conduzido em agitador rotativo a 150rpm e 40°C em frascos Erlenmeyer de 125mL com 50 mL de meio contendo bagaço pré-tratado em quantidade correspondente a um teor inicial de sólidos de 9% m/m. O meio era composto também de nutrientes (5g/L de peptona bacteriológica, 5g/L de extrato de levedura, 1g/L de KH_2PO_4 , 0,3g/L de NH_4Cl e 2g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e enzimas, com uma carga enzimática de 10 FPU (celulases de *Trichoderma longibrachiatum*, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e 10UI (β -Glicosidase, NS50012, Novozymes Latin America Ltda., Araucária, PR, Brasil) por grama de bagaço proveniente do pré-tratamento sulfito alcalino. Durante o processo de fermentação/cofermentação, o qual foi realizado em triplicata, foram retiradas alíquotas periódicas para quantificação de açúcares e etanol.

4.2.6 Avaliação de sistemas SSF e SSCF em reator de coluna de bolhas

Empregou-se reator de coluna com volume de 160mL e diâmetro interno de 30 mm, o qual foi carregado com bagaço pré-tratado (9% s/L), enzimas e nutrientes, conforme descrito na seção 4.2.5.

Para a fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*, o processo foi mantido por 72 horas, enquanto que o processo com *Scheffersomyces stipitis* estendeu-se por 96 horas. Em ambos os casos, os experimentos foram realizados em duplicata e houve retiradas periódicas de alíquotas para quantificação de açúcares e etanol.

4.2.7 Processo de hidrólise e fermentação semissimultânea (SSSF) em batelada alimentada

Empregou-se reator de coluna na temperatura de 50 ° C, o qual foi carregado inicialmente com enzimas e bagaço pré-tratado com 5% de sólidos utilizando uma vazão de aeração inicial de 3 vvm. O reator foi sequencialmente alimentado com mais 5% de sólidos

nos tempo de 6 e 12 horas, atingindo uma quantidade total de bagaço alimentada correspondente a um carregamento com 15% de sólidos. Após 24 horas de hidrólise, a temperatura foi reduzida para 40 ° C e foi adicionado o inóculo com mais 5% de sólidos e nutrientes, sendo a vazão de aeração foi reduzida para 0,5 vvm. O processo de fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* foi mantido por mais 48 horas, resultando em um tempo de total de 72 horas no processo SSSF. Os experimentos foram realizados em duplicata e houve retiradas periódicas de alíquotas para quantificação de açúcares e etanol.

4.2.8 Métodos analíticos

A umidade do bagaço de cana-de-açúcar foi determinada em balança de infravermelho Mark M163 (BEL Engineering, Piracicaba-SP).

Tanto o bagaço *in natura* quanto pré-tratado foram caracterizados quanto a seus componentes (celulose, hemicelulose, lignina e cinzas), seguindo a metodologia descrita por Mesquita, Ferraz e Aguiar (2016).

As análises dos teores de açúcares, ácido acético e etanol foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Agilent Technology 1200 series (Agilent, Estados Unidos). As amostras foram previamente filtradas em filtro Sep Pak C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração RID 6A; fase móvel ácido sulfúrico 0,005 mol/L e fluxo de 0,6 mL/min. A atividade celulolítica foi determinada conforme metodologia descrita por Ghose (1987) e Bailey et al., (1992) para determinação da quantidade de preparação de celulasas que deveria ser adicionada ao meio contendo bagaço de cana-de-açúcar.

A concentração celular foi determinada por turbidimetria por leitura de absorbância a 600 nm empregando um espectrofotômetro (Beckman DU640B, USA). As medidas de absorbância foram correlacionadas com a concentração celular (g/L) mediante uma curva de calibração previamente determinada.

4.3 Resultado e Discussão

4.3.1 Aclimatização Progressiva dos microrganismos

Inicialmente, os microrganismos foram aclimatizados para uso em temperaturas elevadas de fermentação. Após o procedimento com elevações progressivas de temperatura, observou-se crescimento da levedura *S. cerevisiae* na faixa de 37 a 42°C, enquanto a levedura *S. stipitis* cresceu apenas entre 37 e 40°C. O comportamento observado para a cepa de *S. cerevisiae* utilizada já havia sido relatado por Edgardo et al. (2008). Estes autores estudaram a aclimatização (progressiva e por choque térmico) de diferentes cepas de leveduras, entre as quais a *Saccharomyces cerevisiae* IR2, que foi capaz de crescer e fermentar a 40°C e também a 42°C, com um rendimento na produção de etanol de aproximadamente 70% do valor teórico. Para a levedura *Scheffersomyces stipitis*, entretanto, não foram encontrados relatos prévios na literatura sobre sua aclimatização para uso em elevadas temperaturas. Seu uso em processos simultâneos, no entanto, pode ser vantajoso, uma vez que esse microrganismo é capaz de metabolizar pentoses e hexoses. Na figura 19, apresentam-se fotografias das placas de Petri com os microrganismos após a aclimatização progressiva.

O uso de leveduras termotolerantes reduz os custos de produção da conversão de biomassa em etanol. No entanto, informações relacionadas às alterações genéticas subjacentes e funções fisiológicas necessárias para a termotolerância de levedura são escassas (SAINI et al., 2018). As leveduras são eucariontes unicelulares que possuem uma variedade de mecanismos que lhes permitem reconhecer e responder às condições adversas do meio ambiente. A resposta que pode ser obtida em condições adversas resulta, por exemplo, no aumento do metabolismo, podendo ocorrer também inativação do microrganismo e até mesmo sua morte (SAINI et al., 2017).

A aclimatização de leveduras, mesmo das não usualmente termotolerantes, causa mudanças morfológicas no microrganismo, alterando a parede celular. Quando a variação da temperatura é realizada de maneira gradual, durante a aclimatização do microrganismo ocorre à indução de proteínas que aumentam a tolerância da levedura ao estresse térmico, o que pode favorecer o uso dessas cepas aclimatizadas em processos fermentativos com temperaturas mais elevadas (EDGARDO et al., 2008; SAINI et al., 2018; SIQUEIRA JUNIOR et al., 2015).

Figura 4.1 - Microrganismos após aclimatização progressiva (a) *Saccharomyces cerevisiae* aclimatizada (40°C), (b) *Scheffersomyces stipitis* aclimatizada (37°C) e (c) *Scheffersomyces stipitis* aclimatizada (40°C)

(a)

(b)

(c)

Fonte: Próprio autor

O estresse térmico é importante para todas as cepas de levedura durante a fermentação, tendo como resposta a indução de uma classe de proteínas denominadas HSPs - do inglês, “*Heat Shock protein*”, cuja concentração aumenta durante a exposição a altas temperaturas. Essas proteínas controlam o desdobramento e dobramento de diversas outras proteínas, sendo também referidas como biomoléculas de importância industrial (SAINI et al., 2018).

Na aclimatização progressiva dos microrganismos, a levedura *Scheffersomyces stipitis* não cresceu na temperatura de 42 ° C, sendo que essa temperatura foi letal para a levedura. Pode-se observar na Figura 4.1 que mesmo a 37 ° C a levedura *S. stipitis* cresceu na placa de Petri, porém o crescimento não foi tão expressivo quanto o da levedura *Saccharomyces*

cerevisiae IR2, que é um microrganismo termotolerante. Entretanto, o crescimento da levedura *S. stipitis* na temperatura de 40 ° C é um resultado oportuno, considerando que esse microrganismo é capaz de metabolizar hexoses e pentoses, além de a temperatura de 40 ° C ser a temperatura intermediária entre a hidrólise enzimática (50 ° C) e fermentação alcoólica (30 ° C).

4.3.2 Fermentação e Cofermentação em frascos Erlenmeyer

Após a aclimatização, avaliou-se o uso das leveduras para produção de etanol em processos SSF e SSCF em frascos Erlenmeyer e em reator. Nestes experimentos, empregou-se como fonte de carbono bagaço pré-tratado por sulfito alcalino. Este apresentava, antes do pré-tratamento, a seguinte composição: $41,4 \pm 1,5\%$ de glucana, $22,1 \pm 1,0\%$ de xilana, $1,9 \pm 0,1\%$ de arabinosil, $3,1 \pm 0,1\%$ de acetil, $23,2 \pm 1,3\%$ de lignina e $3,2 \pm 0,1\%$ de cinzas. Após o pré-tratamento, a composição obtida foi: $47,1 \pm 1,6\%$ de glucana, $23,3 \pm 1,1\%$ de xilana, $0,9 \pm 0,3\%$ de arabinosil, $0,2 \pm 0,01\%$ de acetil, $13,2 \pm 2,6\%$ de lignina e $3,6 \pm 0,1\%$ de cinzas. Pode-se observar que o pré-tratamento foi eficaz na redução do teor de lignina do material, o que, associado a outras modificações composicionais e estruturais promovidas pelo cozimento com solução de sulfito alcalino, favorece a hidrólise enzimática na etapa posterior (MENDES, 2013).

Os resultados obtidos no processo SSF/SSCF em frascos Erlenmeyer com relação a consumo de açúcares e produção de etanol são apresentados na Figura 4.2. Conforme pode ser observado, ambos os microrganismos foram capazes de produzir etanol nas condições empregadas no processo após a aclimatização progressiva.

Como esperado, a levedura *S. cerevisiae* consumiu apenas glicose (Figura 4.1), cuja concentração no processo SSF aumentou nas primeiras 12h de fermentação, reduzindo-se a valores próximos de zero em 48h. Neste caso, obteve-se $14,6 \text{ g L}^{-1}$ de etanol em 53h de processo, correspondendo a uma produtividade volumétrica de $0,28 \text{ g L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Observou-se também liberação de xilose no meio (Figura 4.2). De fato, a hemicelulose também foi hidrolisada, liberando xilose no meio de cultivo, o que pode ser atribuído à presença de xilanases em preparações comerciais de celulasas. Tendo por base a quantidade inicial de xilana no bagaço pré-tratado e a quantidade de xilose liberada no meio no processo com *S. cerevisiae* (que não consome pentoses), pode-se calcular que 96% da xilana inicialmente presente foi hidrolisada. Com relação à hidrólise da glucana, não foi possível fazer o mesmo cálculo, uma vez que a glicose é simultaneamente gerada e consumida no processo.

Figura 4.2 - Perfil cinético de consumo de substratos e produção de etanol nas fermentações realizadas em frascos Erlenmeyer empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (a) e *Scheffersomyces stipitis* (b) aclimatizadas. (—●—) Glicose; (—▲—) xilose; (—■—) etanol.

Fonte: Próprio Autor

De qualquer forma, caso toda a glucana presente no material pré-tratado tivesse sido transformada em etanol por *S. cerevisiae* com rendimento teórico, 24 g L⁻¹ de etanol teriam sido produzidos no sistema. Assim, processo resultou em produção de etanol correspondente a 62% de seu potencial teórico. Embora sejam necessários experimentos de otimização, estes resultados indicam o potencial da linhagem microbiana avaliada. Realmente, a levedura *S. cerevisiae* IR2 apresenta características interessantes, correspondendo a uma cepa floculante e termotolerante (EDGARDO et al.,2008).

Com relação à levedura *Scheffersomyces stipitis*, os resultados apresentados na Figura 4.2b mostraram consumo de glicose e xilose, embora esta tenha sido metabolizada apenas parcialmente até 72h de processo. O perfil de consumo de açúcares também parece indicar diauxia, pois a queda na concentração de xilose foi observada principalmente após o esgotamento da glicose (Nakamura; Sawada; Inoue, 2001). Neste experimento, 17,4 g L⁻¹ de etanol foram produzidos em 72h de processo, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 0,24 g L⁻¹.h⁻¹.

Tendo sido demonstrado o potencial das leveduras aclimatizadas para produção de etanol em processos SSF e SSCF em frascos Erlenmeyer, avaliou-se o potencial de uso de reatores de coluna de bolhas.

4.3.3 Fermentação e cofermentação em reatores de coluna

No reator de coluna de bolhas foram testadas diferentes condições de aeração, e os resultados obtidos com a levedura *S. cerevisiae* são apresentados na Figura 4.3.

Pode-se observar na Figura 4.3 que, também neste caso, não há indicação de consumo de xilose pelo microrganismo. Esta pentose foi liberada ao longo do processo, resultando em concentrações finais de 13,5 g L⁻¹ a 17,0 g L⁻¹, o que, conforme explicado anteriormente, corresponde a uma hidrólise de 57% a 71% da xilana presente no material pré-tratado. Os valores, neste caso, foram inferiores aos obtidos nos frascos Erlenmeyer, o que pode estar relacionado a limitações na homogeneização do reator. A glicose liberada, por sua vez, parece ter sido totalmente metabolizada para todos os valores de aeração empregados, com consumo mais rápido observado no experimento com 0,7 vvm.

Pode-se observar também na Figura 4.3 que a aeração influenciou na produção de etanol, sendo a maior concentração deste álcool obtida com vazão de ar de 0,3 vvm.

Figura 4.3 - Perfil cinético de consumo de substratos e produção de etanol nas fermentações realizadas em reatores de coluna empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* aclimatizada. (a) 0,3 vvm (b) 0,5 vvm e (c) 0,7 vvm. (—●—) Glicose; (—●—) xilose; (—■—) etanol.

a

Fonte: próprio autor

Neste caso, obteve-se 15,21 g L⁻¹ de etanol em 12h de fermentação, correspondendo a 1,27 g L⁻¹.h⁻¹ de produtividade volumétrica. Em 48h de processo, 18,35 g L⁻¹.h⁻¹ de etanol foram produzidos, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 0,38 g L⁻¹.h⁻¹. Com relação ao máximo teórico de etanol que poderia ser obtido a partir da glucana disponível no sistema, obteve-se, em 12h e 48h de processo, respectivamente, 63% e 76%. Esses resultados corroboram com relatos da literatura. Ballesteros et al., (2004), por exemplo, utilizaram resíduos da árvores Álamo (*Populus nigra*) para produzir etanol de segunda geração na configuração SSF em frascos Erlenmeyer de 100 mL, usando uma carga de celulasas de 15 FPU/g de biomassa, um teor de sólidos (S/L) de 10% dentro do reator e a levedura

Kluyveromyces marxianus CECT 10875. O processo foi conduzido a 42 ° C durante 82 horas e os autores obtiveram uma eficiência de fermentação de 71,2% e uma concentração final de etanol de 19 g L⁻¹. Esses mesmo autores utilizaram sorgo doce como substrato e obtiveram 60,9% de eficiência de fermentação e 16 g L⁻¹ de etanol após 82 horas de processo.

A levedura *S. stipitis* aclimatizada também foi avaliada para produção de etanol em processo SSCF em reator de coluna de bolhas. Os resultados são mostrados na Figura 4.4. Pode-se observar que a aeração influenciou fortemente no processo SSCF, resultando em diferentes perfis cinéticos de acúmulo e consumo de açúcares e produção de etanol.

Os dados da Figura 4.4 mostram que os maiores valores de concentração de etanol foram obtidos para aeração de 0,5 vvm e 0,7 vvm. Com aeração de 0,5 vvm, 14,7 g L⁻¹ de etanol foram obtidos em 48h de processo, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 0,31 g L⁻¹.h⁻¹. Neste mesmo experimento, 13,7 g L⁻¹ de etanol haviam sido produzidos em 24h de fermentação, correspondendo a uma produtividade volumétrica de 0,57 g L⁻¹.h⁻¹. Quando a vazão de ar empregada foi de 0,7 vvm, 15,1 g L⁻¹ de etanol foram obtidos em 24h de processo, resultando em uma produtividade volumétrica de 0,62 g L⁻¹.h⁻¹. O perfil de consumo de açúcares e produção de etanol observado nos experimentos realizados com 0,5 vvm e 0,7 vvm indicam que, nesta faixa de aeração, maior vazão de ar resultou em um metabolismo mais rápido dos açúcares produzidos. A vazão de ar de 0,3 vvm, no entanto, apresentou um perfil diferenciado, com um consumo de xilose aparentemente mais rápido, porém com menor concentração final de etanol, cuja concentração atingiu 12,54 g L⁻¹ em 12h de processo e permaneceu praticamente constante até o final do processo, mesmo com a continuidade do consumo de açúcares. A produtividade volumétrica em 12h, foi de 1,04 g L⁻¹.h⁻¹.

Figura 4.4 - Perfil cinético de consumo de substratos e produção de etanol nas co-fermentações realizadas em reatores de coluna empregando a levedura *Scheffersomyces stipitis* aclimatizada. (a) 0,3 vvm (b) 0,5 vvm e (c) 0,7 vvm. (—♦—) Glicose; (—▲—) xilose; (—■—) etanol.

Fonte: próprio autor

A variação na aeração influencia fortemente o metabolismo de açúcares por *S. stipitis*, sendo que, dependendo das condições empregadas, pode-se favorecer a via respiratória e o crescimento celular ou vias de manutenção e fermentação (Nakamura; Sawada; Inoue, 2001). No caso específico do metabolismo de pentoses, a influência da aeração está relacionada

também à recuperação de cofatores nas vias fermentativa e respiratória e nas velocidades relativas das enzimas iniciais do metabolismo de xilose (KRUGER; SCHAEWEN, 2003).

A Tabela 4.1 apresenta um sumário de parâmetros de fermentação e outros resultados relevantes obtidos nos processos de fermentação e cofermentação avaliados.

Tabela 4.1 - Parâmetros e outros resultados relevantes obtidos na fermentação e cofermentação realizados no reator de colunas de bolhas usando diferentes fluxos de aeração. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

	Fermentação com <i>S. cerevisiae</i> (12 h de fermentação)			Cofermentação com <i>S. stipitis</i> (24 h de co-fermentação)		
Aeração	0,3	0,5	0,7	0,3	0,5	0,7
Eficiência (%)*	67,4	79,0	69,8	58,0	61,1	62,3
Qp (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,94	1,58	1,36	0,35	0,64	0,63
Concentração de etanol (g L ⁻¹)	15,2	13,4	12,3	12,54	13,7	15,1
pH _{final} **	4,5	4,3	4,0	4,3	4,5	4,1

* Calculado considerando 0,51 g g⁻¹ como o rendimento teórico; **pH inicial: 4,8;

Fonte: Próprio autor

Pode-se observar na Tabela 4.1 que, de uma forma geral, em todas as aerações testadas, a produtividade volumétrica Qp e a eficiência dos processos fermentativos foram superiores nos experimentos de fermentação, sendo que a concentração de etanol variou de 12,3 a 15,2 g L⁻¹ em 12 horas de fermentação. Esses valores de concentração de produto são similares aos encontrados no processo de cofermentação (12,54 a 15,1 g L⁻¹), porém neste caso em 24 horas de processo.

Existem relatos na literatura com diversas estratégias para a produção de etanol de segunda geração em reatores. Antunes et al., (2017), por exemplo, produziram etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar em reator de coluna encamisado com 2 litros de capacidade. Esses autores utilizaram a estratégia de conduzir todas as etapas sequencialmente dentro do mesmo reator sem precisar abri-lo durante todo o processo (pré-tratamento alcalino, hidrólise enzimática e fermentação). Após 72 h de hidrólise (20 FPU/g_{bagaço} e 0,1 g de surfactante Twin

20) da biomassa pré-tratada, na condição otimizada do planejamento experimental utilizado pelos autores, obtiveram 87% e 43% de rendimento de hidrólise da glucana e da xilana em reator de leito fluidizado. Após a hidrólise enzimática, foram adicionados $0,2 \text{ g L}^{-1}$ da levedura *Scheffersomyces shehatae* para início da fermentação, que ocorreu a 30°C durante 48 horas na vazão de aeração de 0,2 vvm, obtendo-se um rendimento de etanol de $0,34 \text{ g/g}$ com uma produtividade volumétrica de $0,18 \text{ g L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Em outro trabalho Ballesteros et al., (2004), utilizando diversas fonte de biomassa pré-tratadas por explosão a vapor (palha de trigo, sorgo doce, madeira de eucalipto, mostarda da abíssinia) realizaram fermentação simultânea a 42°C utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 em frascos Erlenmeyer de 100 mL usando uma carga de celulasas de 15 FPU/g de biomassa e um teor de sólidos (S/L) de 10% dentro do reator. O processo foi conduzido a 42°C durante 82 horas e obteve-se de 16 a 19 g L^{-1} de etanol e eficiência de fermentação de 60,9 a 71,2 %, dependendo da biomassa utilizada.

Após o estudo da aeração no reator de coluna, avaliou-se também o aumento do teor de sólidos no sistema. Isto foi feito, no entanto, empregando-se como estratégia um processo SSSF em batelada alimentada com pulsos de bagaço de cana-de-açúcar.

4.3.4 Fermentação semissimultânea em reator de coluna

Com base nos experimentos de fermentação e cofermentação simultâneas descritas acima, procedeu-se à realização de novos experimentos a fim de obter maior concentração final de etanol. Neste sentido, foi necessário o aumento do carregamento de sólidos no reator para obter uma quantidade significativa do produto final. Entretanto, como a agitação do reator de coluna de bolhas é promovida pela própria aeração, isso dificultou a mistura dentro do sistema quando se utilizou um elevado carregamento de sólidos. A estratégia para obter um incremento no carregamento de sólidos nesse tipo de reator foi alimentação sequencial de sólidos dentro do reator em um sistema de batelada alimentada por pulsos. Na Figura 4.5 são apresentados os resultados experimentais obtidos com esta estratégia. Pode-se observar que, nas primeiras 24 horas, houve uma elevada formação de açúcares, atingindo 70 g L^{-1} de glicose e 25 g L^{-1} de xilose, correspondendo aproximadamente 80 % da hidrólise da glucana e 60 % da hidrólise da xilana. Com a adição do inóculo e redução da temperatura para 40°C , a levedura *Saccharomyces cerevisiae* IR2 consumiu o correspondente a 92 % da concentração de glicose atingida em 24 horas de processo. A produção de etanol após 12 horas da adição do

inóculo foi de 15 g L^{-1} , atingindo-se 25 g L^{-1} de etanol no final da fermentação com uma produtividade volumétrica de $0,36 \text{ g L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. De qualquer forma, caso toda a glucana presente no material pré-tratado tivesse sido hidrolisada, considerando um rendimento de hidrólise enzimática de 100%, atingir-se-ia uma concentração de 90 g L^{-1} de glicose. Assim, o processo resultou em produção de etanol correspondente a 52% de seu potencial teórico.

Figura 4.5 - Perfil cinético de consumo de substratos e produção de etanol nas fermentações realizadas em reatores de coluna empregando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* aclimatizada em processo SSSF em bateladas alimentadas por pulsos de bagaço. A vazão utilizada foi 3 vvm nas primeiras 24h e depois reduzida para 0,5 vvm. Resultados foram reportados para (—●—) Glicose; (—▲—) xilose e (—■—) etanol. Os valores apresentados correspondem à média $\pm$ desvio padrão

Fonte: Próprio autor

Esta baixa eficiência pode estar relacionada a fatores como estresse osmótico da levedura reduzido após aclimatização, ou também ao desvio do metabolismo para a produção de biomassa. A segunda hipótese já foi reportada na literatura. Deesuth et al. (2015) relataram a produção de etanol a partir de sorgo sacarino por *S. cerevisiae* sob diferentes condições de aeração a 30°C em modo de batelada em um balão de ar de 500 mL e um fermentador de 2 L. Seus resultados indicaram que a concentração de etanol aumentou com um aumento na

taxa de aeração até um ponto específico, além do qual a concentração de etanol declinou quando taxas mais altas foram aplicadas.

4.4 Conclusão

A aclimatização progressiva das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* IR2 e *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124 possibilitou seu uso na produção de etanol em processos SSF e SSCF a 40°C. Em frascos Erlenmeyer, a quantidade de etanol produzida pela levedura *S. cerevisiae* correspondeu a uma concentração máxima de 15 g L⁻¹ e uma produtividade de 0,31 g L⁻¹.h⁻¹. Neste caso, com a levedura *S. stipitis*, obteve-se 17 g L⁻¹ de etanol, correspondendo a uma produtividade de 0,24 g L⁻¹.h⁻¹. A aeração influenciou na produção de etanol pelas leveduras aclimatizadas em sistemas SSF/SSCF nos processos conduzidos em reator de coluna de bolhas. Para a levedura *S. cerevisiae*, menor aeração favoreceu a produção de etanol, com 15,21 g L⁻¹ de álcool produzidos em 12h de fermentação aerada com 0,3 vvm, correspondendo a 1,27 g L⁻¹.h⁻¹ de produtividade volumétrica. O processo SSCF com *S. stipitis*, por sua vez, também foi fortemente influenciado pela aeração, cuja variação resultou em modificação nos perfis cinéticos de consumo de açúcares e produção de etanol. Empregando vazão de ar de 0,3 vvm, obteve-se 12,54 g L⁻¹ de etanol em 12h de processo, correspondendo a uma produtividade de 1,04 g L⁻¹.h⁻¹. A maior concentração de etanol nestes experimentos de SSCF foi obtida com 0,5 vvm, correspondendo a 16 g L⁻¹ de álcool produzidos em 72h de fermentação. Com a estratégia de hidrólise e fermentação semissimultânea em sistema com alimentação de bagaço por pulsos, obteve-se 25 g L⁻¹ de etanol, correspondendo a 52 % do potencial teórico de produção do sistema. Demonstrou-se assim o potencial dos sistemas avaliados para uso em biorrefinarias de etanol 2G, sendo necessários trabalhos futuros de otimização do processo visando à obtenção de maiores concentrações de produto final.

Referências

AMAYA-DELGADO, L.; FLORES-COSÍO, G.; SANDOVAL-NUÑEZ, D.; ARELLANO-PLAZA, M.; ARRIZON, J.; GSCHAEGLER, A. Comparative of Lignocellulosic Ethanol Production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Intechopen-Special Topics in Renewable Energy Systems**, v.1, p.1-20, 2018.

ANTUNES, F.A.F.; CHANDEL, A.K.; BRUMANO, L.P.; TERAN HILARES, R.; PERES, G.F.D.; AYABE, L.E.S.; SORATO, V.S.; SANTOS, J.R.; SANTOS, J.C.; S.S. DA SILVA. A novel process intensification strategy for second-generation ethanol production from sugarcane bagasse in fluidized bed reactor. **Renewable Energy**, p. 1-8, 2017.

ASK, M.; OLOFSSON, K.; DI FELICE, T.; PENTTILÄ, M. L.; LIDÉN, G.; OLSSON, L. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. **Process Biochemistry**, v. 47 p.1452-1459. 2012.

ATTFIELD, P.V.; KLETSAS, S. Hyperosmotic stress response by strains of bakers' yeasts in high sugar concentration medium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 323-327, 2000.

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.

BAILEY, M. J.; BIEL, Y P.; POUTANEN, K. **Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity**. **Journal of Biotechnology**, v. 23 p. 257–270, 1992.

BOUDET, A. M. Editorial: A new era for lignocellulosics utilization through biotechnology. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, p. 777-780, 2011.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4862-4874, 2009.

BNDES e CGEE. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, Brasil: BNDES, 2008.

CHERUBINI F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, n. 51 p. 1412–142, 2010.

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

D'AMORE, T.; PANCHAL, C. J.; RUSSELL, I. STEWART, G. G. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 2 p. 365-372, 1988.

GONZALEZ, R.; DAYSTAR, J.; JETT M.; TREASURE, T.; JAMEEL, H.; VENDITTI, R. PHILLIPS R.. Economics of cellulosic ethanol production in a thermochemical pathway for softwood, hardwood, corn stover and switchgrass. **Fuel Processing Technology**, v. 94 p. 113–122, 2012.

GHOSE, T. K; Measurement of cellulase activities, Measurement of Cellulase Activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

EDGARDO A.; CAROLINA P.; MANUEL R.; JUANITA F.; JAIME B. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.43 p.120-123, 2008.

ELLISTON, A.; COLLINS, S.R.A.; WILSON, D. R.; ROBERTS, I. N.; WALDRON, K. W. High concentrations of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi simultaneous saccharification and fermentation of waste-paper. **Bioresource Technology**, v. 134, p.127-136, 2013.

KRUGER, N. J.; SCHAEWENY, A. V. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organization. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6 p. 236-246, 2003.

MENDES, F. M.; LAURITO, D. F.; BAZZEGGIO, M.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enzymatic digestion of alkaline-sulfite pretreated sugar cane bagasse and its correlation with the chemical and structural changes occurring during the pretreatment step. **Biotechnology Progress**, v. 4 p. 890-895. 2013.

MENDES, F. M.; HEIKKILÄ, E.; FONSECA, M. B.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A.; FARDIM, P. Topochemical characterization of sugar cane pretreated with alkaline sulfite. **Industrial Crop and Products**, v. 69, p. 60–67, 2015.

MEDINA K. J. D. **Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52,2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético**, 2013. (Tese de Doutorado): Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

MESQUITA, J. F. Alkaline-sulfite pretreatment and use of surfactants during enzymatic hydrolysis to enhance ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 441-448, 2016.

MODENBACH, A.; NOKES, S. E. The Use of High-Solids Loadings in Biomass Pretreatment—A Review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 1430- 1443. 2013.

NAKAMURA Y SAWADA T, INOUE E. Mathematical model for ethanol production from mixed sugars by *Pichia stipitis*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.76 n.1 p. 586-592, 2001.

SAINI, P.; BENIWAL, A. KOKKILIGADDA, VIJ, A. Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation . **Process Biochemistry**, v. 72, p. 1-12, 2018.

SAINI, P.; BENIWAL, A.; VIJ, A. Comparative Analysis of Oxidative Stress During Aging of *Kluyveromyces marxianus* in Synthetic and Whey Media. **Appl Biochem Biotechnol**, . v.183 p. 348–361, (2017).

SILVA, L., **Estudo da hidrólise enzimática em alta consistência de materiais lignocelulósicos**. 2012, (Dissertação de Mestrado): Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2012.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**. v. 33, p. 511-525, 2015.

SIQUEIRA, JUNIOR. E.F.; FILHO, C.D.F.; SILVA, A. F.; GUERREIRO, J.; RODRIGUES E. D.; LIMA S. T. C. Searching resistance markers in *Saccharomices sp* under ethanol stress by protein profiling and ultrastructure analysis. In: **Simpósio Internacional de Inovação e Tecnologia**, 2015 p. 276-292.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R. O.; SCARLATA, C.; SLUITER, J. TEMPLETON, D.; ENERGY, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure**, p.1-14. 2012.

TETE, M. F. Vínculos entre instituições e funções na formação de um sistema tecnológico de inovação: o caso do etanol de segunda geração brasileiro. 2016. (Tese de doutorado)- Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

TERÁN-HILARES, R. T.; IENNY, J; V.; MARCELINO, P.F.; AHMED, M. A. Ethanol production in a simultaneous saccharification and fermentation process with interconnected reactors employing hydrodynamic cavitation-pretreated sugarcane bagasse as raw material. **Bioresource technology**, v. 243 p. 652-659, 2017.

VAN ZYL, W.H.; CHIMPHANGO, A. F. A.; DEN HAAN, R.; GÖRGENS, J; F.; CHIRWA, P. W. C. Next-generation cellulosic ethanol technologies and their contribution to a sustainable Africa. **Interface focus**, v.1n.1 p.196-211, 2011.

5 SIMULAÇÃO E ANÁLISE DA VIABILIDADE ECONÔMICA DE UMA BIORREFINARIA INTEGRADA 1G2G DE PRODUÇÃO DE ETANOL E ELETRICIDADE EMPREGANDO PRÉ-TRATAMENTO SULFITO ALCALINO E BIORREATOR DE COLUNA PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

RESUMO

As biorrefinarias são modelos de plataformas industriais que contemplam o máximo aproveitamento da matéria-prima, obtendo-se uma gama de produtos distintos. Atualmente, biorrefinarias de cana-de-açúcar são produtoras principalmente de etanol de primeira geração e energia elétrica. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e analisar economicamente modelos de biorrefinarias integradas 1G2G em que se utiliza pré-tratamento sulfito alcalino e biorreator de coluna na hidrólise enzimática. Foram avaliados 8 cenários, alterando-se o teor de sólidos na etapa de hidrólise enzimática (9% e 14% de razão sólido:líquido) e o tempo da reação de hidrólise (8 e 24 horas). As simulações dos cenários foram realizadas com o auxílio do pacote computacional Aspen plus®, obtendo-se os dados de balanço de massa e energia e permitindo assim a análise da viabilidade econômica utilizando a plataforma Biorrefinaria Virtual de cana-de-açúcar (BVC). O rendimento de produção de etanol anidro variou de 46,05 a 53 L/TC e o excedente de eletricidade variou de 33,33 a 43,17 kWh/TC. Com relação ao custo de investimento, este correspondeu a R\$ 785,50 milhões para biorrefinaria 1G, enquanto os cenários integrados 1G2G apresentaram valores cerca de 17% a 35% superiores. No que concerne ao custo de produção de etanol, os cenários que apresentaram menor valor para etanol 1G2G (R\$ 1,80/kg) foi o cenário III de cofermentação. Com relação à taxa interna de retorno (TIR), esta se apresentou abaixo da taxa mínima de atratividade (TMA de 12%) nos cenários avaliados de produção etanol 1G2G e eletricidade, indicando a necessidade de estudos futuros de alternativas como a inclusão de outros produtos nas biorrefinarias propostas.

Palavras-chaves: Reator de Coluna. Simulação de Processos. Análise de viabilidade Econômica. Biorefinaria integrada 1G2G.

5.1 Introdução

A simulação de bioprocessos corresponde ao uso de modelos computacionais que reproduzem processos ou operações do mundo real. É uma ferramenta que representa uma alternativa de baixo custo para a criação e verificação de projetos, melhor compreensão de processos complexos fortemente integrados e para comparação de diferentes rotas tecnológicas, além de otimização e implementação de sistemas de controle (FONSECA, 2014). Sua maior vantagem está em permitir a análise do processo como um todo e não apenas operações unitárias. Dentre outras vantagens da simulação estão: o teste de hipóteses, a estimativa do tempo de processo, ampliação do conhecimento sobre a interação e importância de determinadas variáveis no sistema e o entendimento de sua operação (DIAS et al., 2011).

O pacote computacional Aspen Plus® é o simulador de processos mais utilizado no mundo, possuindo dados termodinâmicos e modelos para propriedades físicas e equipamentos. Permite simular o comportamento real de uma planta industrial e utiliza diferentes modelos para propriedades físicas, sendo apontado como o mais completo em comparação a outros para uso na área de biorrefinarias (DIAS, 2011; ASPENTECH, 2017). É apoiado por fortes bases de dados, conjuntos completos de módulos e simulação com ferramentas flexíveis (WEIFENG et al., 2006).

Além de fornecer os dados de balanço de massa e energia para avaliação técnica, a simulação fornece parâmetros para a análise de viabilidade econômica de um dado processo (DIAS et al., 2011). De fato, a análise de viabilidade econômica corresponde a uma ferramenta fundamental para nortear trabalhos de pesquisa aplicada, auxiliando na seleção de alternativas de processo.

Os estudos de viabilidade econômica têm contribuído bastante nos últimos anos no desenvolvimento de biorrefinarias (DIAS et al., 2013; QUINTERO; CARDONA, 2011 mais recentes). Alguns dos estudos relacionados à simulação de biorrefinarias de cana-de-açúcar têm abordado aspectos econômicos, como os custos de operações ou até mesmo os valores de mercados dos produtos avaliados (MONCADA et al., 2013; RAICHER, 2011). Desta forma, a definição e escolha dos parâmetros do processo, ou do melhor arranjo dependem também dessa abordagem.

Para avaliação de cenários industriais de biorrefinarias, a Biorrefinaria Virtual de Cana-de-açúcar (BVC), em desenvolvimento no Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR/CNPEN/MCTI), possibilita considerar a integração de novas tecnologias nas fases

agrícolas, industrial e de uso à cadeia produtiva de cana-de-açúcar e outras biomassas, avaliando as estruturas básicas: econômica, ambiental e social. São diversas as tecnologias utilizadas pela BVC, estando incluída a produção de etanol celulósico (2G), as diferentes estratégias de comercialização e uso do etanol como biocombustível, além de outras. Assim, a BVC se destaca como uma importante ferramenta para utilização pela comunidade científica e industrial nacional e internacional (BONOMI et al., 2016).

Tecnologias como a produção de etanol de segunda geração por diferentes processos de hidrólise e pré-tratamento são exemplos em evidência da utilização da BVC para simulação e a análise técnica-econômica no âmbito de biorrefinarias de cana-de-açúcar. A verificação da viabilidade de acoplamento de novos produtos à cadeia produtiva de cana-de-açúcar também é um exemplo de aplicação (MARIANO et al., 2013; RIVERA et al., 2014, MENDES et al., 2017).

Neste contexto, o uso de softwares de simulação de processos se aplica, pois com a sua utilização é possível conhecer os valores das variáveis de uma forma geral, permitindo o cálculo dos custos associados e parâmetros de análise econômica (ASPENTECH, 2017). Um exemplo de parâmetro econômico útil para a análise de viabilidade econômica de biorrefinarias é a taxa interna de retorno (TIR) utilizada por Dias et al. (2011 e 2012), que permite mostrar qual investimento apresenta maior rentabilidade. Este parâmetro foi empregado, por exemplo, no trabalho Mendes et al. (2017), no qual se avaliou a viabilidade econômica de utilização de seis diferentes híbridos de cana-de-açúcar, usando como base a plataforma BVC. Neste trabalho, o pacote computacional Aspen Plus® foi utilizado como ferramenta para estimar a produção de eletricidade, açúcar e etanol em biorrefinarias de primeira geração. Além da TIR, determinaram-se outro indicador e de desempenho econômico, a VPL (valor presente líquido). Os três híbridos com maior produtividade de campo e conteúdo de fibra (H89, H58 e H140) resultaram nos melhores indicadores econômicos quando utilizados para produção de eletricidade, açúcar e etanol em biorefinarias de primeira geração. O preço do álcool foi especialmente crítico para a TIR das destilarias autônomas, reforçando a importância das biorrefinarias multiproduto.

Em trabalho recente de Mendes et al (2018), foram avaliados híbridos de cana-de-açúcar desenvolvidos por meio de engenharia genética e melhoramento de plantas para produzir culturas lignocelulósicas mais suscetíveis à produção de biocombustíveis de segunda geração. A avaliação dessas plantas exige desenvolvimento de processo combinado com avaliação econômica adequada. Nesse estudo foi considerado o pré-tratamento sulfito alcalino de biomassa de cana-de-açúcar derivado de quatro híbridos de previamente

selecionados e foi avaliada a produção de etanol de segunda geração integrada a uma biorrefinaria de primeira geração. A análise econômica foi simulada em 32 cenários de biorrefinaria, incluindo diferentes condições de pré-tratamento (alta e baixa severidade), tempo de hidrólise enzimática (24 e 72 h) e destino de pentoses (fermentação a etanol ou descarte). O pré-tratamento severo mostrou-se eficiente para aumentar a produção de etanol; no entanto, o custo do sulfito de sódio foi relevante no custo do etanol 1G2G. O melhor cenário de biorrefinaria correspondeu ao híbrido de cana-de-açúcar H89, processado em com 72 h de hidrólise enzimática e cofermentação C5 e C6. Para este cenário, a análise de sensibilidade paramétrica indicou que os preços máximos de sulfito de sódio para alcançar a taxa de retorno mínima aceitável (12%) foram de US \$ 0,66 / kg e US \$ 0,47 / kg para pré-tratamentos severos e leves, respectivamente, ajudando assim avaliar o efeito dos custos do sulfito de sódio na TIR da biorrefinaria.

No presente trabalho procedeu-se à simulação e análise da viabilidade econômica de uma biorrefinaria integrada 1G2G de produção de etanol e eletricidade empregando pré-tratamento sulfito alcalino e biorreator de coluna para a hidrólise enzimática. A seleção do pré-tratamento sulfito alcalino foi baseada em algumas vantagens desta técnica, incluindo a sulfonação da lignina residual que apresenta menor adsorção improdutiva de celulasas em comparação com a lignina hidrofóbica original (ZHU et al., 2009; MENDES et al., 2013). Assim, as principais vantagens deste método são a alta deslignificação e retenção de polissacarídeos, além da sulfonação parcial da lignina (MESQUITA et al., 2016; WANG et al., 2018). Com relação ao biorreator de coluna, este foi selecionado com base em trabalhos em andamento no Laboratório de Biopolímeros, Biorreatores e Simulação de Processos – LBBSIM, da Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo (TERÁN-HILARES et al., 2016; TERÁN-HILARES et al., 2017). Estes trabalhos têm considerado biorreatores de coluna em função de sua simplicidade, o por permitir maior teor de sólidos, pela facilidade de operação e construção do reator e possibilidade de ampliação de escala do processo.

5.2 Metodologia

5.2.1 Definição de Cenários

O presente trabalho foi desenvolvido empregando dados experimentais obtidos anteriormente e disponíveis nos grupos de pesquisa do LOT/EEL-USP, os quais foram utilizados na etapa de síntese e simulação dos processos tendo por base a BVC e trabalhos que utilizam cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de etanol de primeira e segunda geração.

Para o desenvolvimento desses cenários foram consideradas biorrefinarias que processam 500 toneladas de colmo de cana-de-açúcar por hora (500 TC/h), operando 24 horas por dia e 200 dias por ano, otimizadas para maximizar a produção de eletricidade, com caldeiras para produção de vapor a alta pressão (65 bar) e altas temperaturas (485°C) (DIAS et al., 2013).

O processo de Etanol 1G incluiu, em suas configurações, a extração do caldo da cana-de-açúcar, que, em alguns cenários considerados, foi fermentado com o licor C6 proveniente das etapas 2G. Consideraram também cenários nos quais o licor C6 era cofermentado com licor C5 na etapa 2G, de forma independente do caldo de cana-de-açúcar rico em C12. O subproduto da moagem, o bagaço de cana-de-açúcar, seguiu para queima, juntamente com a palha de cana, gerando vapor e eletricidade no sistema de cogeração. A palha de cana de açúcar é produzida na proporção de 140 kg por tonelada de cana-de-açúcar e considerou-se que 50% dessa palha (com 15% de umidade) eram recolhidas do campo e encaminhado à usina para queima (DIAS et al., 2013). O bagaço excedente (que não foi queimado) da cogeração de energia foi destinado para produção de etanol 2G.

O bagaço excedente foi pré-tratado por pré-tratamento sulfito alcalino (Mendes et al., 2013), sendo que a fração sólida seguiu para hidrólise enzimática e o resíduo da hidrólise, denominada celulignina, foi queimado no sistema de cogeração como combustível complementar. O licor C5C6 proveniente da hidrólise enzimática da Hierarquia 2G foi concentrado juntamente com o caldo da cana para a realização da fermentação, no caso da cofermentação, o licor C5C6 foi levado para a sub-hierarquia C5C6FERM (dentro da Hierarquia 2 G), onde foi concentrado e fermentado. Posteriormente o vinho C5C6 e o vinho C6C12 foram enviados para a destilação e desidratação, onde foi produzido etanol anidro 99,6 °GL.

Na Figura 5.1 apresenta-se um fluxograma esquemático da produção integrada 1G2G considerada.

Figura 5.1 - Fluxograma esquemático da produção de etanol 1G2G, processo em destilarias autônomas 1G (blocos brancos) e processo 2G (blocos cinza). A linha pontilhada representa os cenários C5 e C6 foram fermentadas separadas do caldo de cana.

Fonte: Adaptado de Mendes et al.,(2018)

As etapas de produção de etanol de uma biorrefinaria 1G2G integrada foram baseadas nos trabalhos de simulação de Mendes et al., (2018) com o uso de dados experimentais para etapa de pré-tratamento e da hidrólise enzimática. Para estas, empregaram dados experimentais obtidos no LBBSIM (Laboratório de Biopolímeros Biorreatores e Simulação de Processos), no âmbito da presente tese de doutorado (Capítulo 3).

Foram definidos oito cenários, sendo quatro cenários com fermentação C6C12 e quatro cenários de fermentação C12 com a cofermentação C5C6, alterando-se o teor de sólidos na etapa de hidrólise enzimática (9% e 14% de razão sólido:líquido) e o tempo de reação de hidrólise 8 e 24 horas. A Tabela 5.1 sumariza as condições de cada um dos cenários propostos.

A Figura 5.2 apresenta o fluxograma do processo sintetizado no programa Aspen Plus® (Aspentech, Bedford, Estados Unidos). Uma representação esquemática do destino do bagaço de cana-de-açúcar excedente (Hierarquia 2G) nos cenários simulados é apresentada na Figura 5.3.

Figura 5.2 - Fluxograma geral simulado no programa Aspen Plus® representando o cenário de fermentação e as Hierarquias de processamento (a) e fluxograma de cofermentação da Hierarquia C5C6FERM, dentro da Hierarquia 2 G (b)

Fonte: Próprio autor

As simulações foram realizadas para obtenção dos balanços de massa e energia, a partir dos quais foram feitas determinações quantitativas de matérias-primas, consumíveis,

utilidades e necessidades energéticas. As simulações forneceram as informações necessárias para determinar indicadores de sustentabilidade econômica, calculadas no âmbito da BVC.

Figura 5.3 - Fluxograma de simulação da hierarquia 2G sintetizado no programa Aspen Plus®

Fonte: Próprio autor

Tabela 5.1 - Condições de cada um dos cenários propostos

Cenários	Teor de sólidos no reator de hidrólise (%)	Conversão da celulose na hidrólise enzimática (%) - tempo de reação(h)	Conversão da hemicelulose na hidrólise enzimática (%) - tempo de reação	Cofermentação C5C6
I	14%	81% - 24h	75% - 24h	Sim
II	14%	56% - 8h	67% - 8h	Sim
III	9%	86% - 24h	76% - 24h	Sim
IV	9%	58% - 8h	38% - 8h	Sim
V	14%	81% - 24h	75% - 24h	Não
VII	14%	56% - 8h	67% - 8h	Não
VI	9%	86% - 24h	76% - 24h	Não
VIII	9%	58% - 8h	38% - 8h	Não

Fonte: Próprio autor

5.2.2 Síntese e simulação da biorrefinaria integrada 1G2G

O fluxograma apresentado na Figura 5.2(a,b) representa um modelo da simulação da biorrefinaria integrada 1G2G. O fluxograma é dividido em hierarquias, sendo estas a PREP-EXT, que é responsável pelo preparo e extração do caldo de cana na etapa de moagem; a 2G, que é responsável pelo pré-tratamento, hidrólise enzimática, concentração e fermentação do licor C5C6; CHP, correspondente ao processo de cogeração de vapor e eletricidade e, por último, ETHANOL, na qual ocorre a concentração e fermentação do licor C6/C12, destilação e desidratação do etanol. Estes foram sintetizados e simulados conforme descrito pelo livro “*Virtual biorefinery – an optimization strategy for renewable carbon valorization*” (BONOMI et al., 2016), tendo por base a plataforma BVC.

Os parâmetros de processos necessários para simulação das hierarquias PREP-EXT, CHP foram baseados em Mendes et al. (2017) e, para a hierarquia 2G, Mendes et al., (2018), sendo que para hierarquia ETHANOL foi utilizada a plataforma BVC (BONOMI et al., 2016).

5.2.2.1 Definição dos componentes usados no programa Aspen Plus®

Para a realização da simulação foi necessário especificar todos os componentes do processo, sendo eles os materiais de partida ou os produtos formados. Alguns componentes já se encontravam na base de dados do simulador, sendo que outros foram criados e suas propriedades especificadas, conforme realizado por Dias (2011).

Para a simulação do processo de produção de etanol no simulador foi selecionada a corrente material classe MIXCISLD com duas subcorrentes: a MIXED e a CISOLID. A subcorrente CISOLID é utilizada para definir componentes convencionais que aparecem na fase sólida, mas que não participam no equilíbrio de fases, enquanto a subcorrente MIXED é utilizada para inserir os demais componentes que atingem equilíbrio de fases.

5.2.2.2 Cana-de-açúcar

Em todos os cenários propostos foi considerada como matéria-prima cana-de-açúcar usual em usinas de álcool, sendo considerada a composição do bagaço fornecido pela Usina Vale Onda Verde, localizada no município de Onda Verde/SP. A composição da corrente de alimentação de cana-de-açúcar foi baseada nos dados experimentais de composição do bagaço

de cana-de-açúcar obtidos no âmbito da presente tese (Capítulo 3), complementados com dados da BVC. A Tabela 5.2 apresenta a composição do bagaço da cana-de-açúcar considerada, além das vazões mássicas adotadas na simulação.

Tabela 5.2 - Composição do bagaço de cana-de-açúcar e vazões mássicas adotadas

Componente	Vazão mássica (Kg/h)	Fração mássica (%)
Substream Mixed		
Glicose	3026,0	0,007
Água	354506,5	0,8011
Ácido fosfórico	151,3	0,0003
Minerais	1008,6	0,002
Ácidos orgânicos	2824,3	0,006
Sais	7968,7	0,018
Sacarose	67000	0,154
Substream Cisolid		
Acetato	1660,4	0,0032922
Celulose	29839,9	0,0599
Lignina	16721,9	0,0321
Terra	3018	3,32
Xilana	15292,0	0,0321078

Fonte: Próprio autor

5.2.3 Pré-tratamento sulfito alcalino e hidrólise enzimática

Nesta parte do estudo teve-se como objetivo a simulação do processo de produção de etanol por hidrólise enzimática a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Neste processo têm-se duas etapas principais: a primeira é o pré-tratamento para a solubilização da hemicelulose e liberação da lignina e a segunda é o processo de hidrólise enzimática.

Na simulação, o bagaço proveniente da moagem da cana que não foi queimado (BAG-EXC), é alimentado no reator de pré-tratamento (PT-RCT1) juntamente com uma corrente de sulfito (SULF-ALK). Foram utilizadas concentrações de 5% m/m de NaOH e 10% m/m de Na₂SO₄ (percentuais em relação à biomassa seca). Para simular a etapa do pré-tratamento, utilizou-se no simulador um reator estequiométrico (Rstoicmodel), no qual as reações são especificadas por suas equações químicas. Nas equações 6,7 e 8 são apresentadas as reações de conversão da celulose em glicose, da hemicelulose em xilose e da lignina insolúvel em

lignina solúvel, respectivamente. Os valores de conversão considerados foram os obtidos experimentalmente no âmbito da presente tese (Capítulo 3)

Para haver o aproveitamento do calor liberado, foi necessário o resfriamento do reator de pré-tratamento, sendo considerado seu flasheamento até o equilíbrio da pressão interna com a externa, ou seja, de 1 atm. Esse calor liberado foi utilizado para aquecer o reagente sulfito alcalino na alimentação do reator de pré-tratamento.

O bagaço pré-tratado (PT-BAG) foi filtrado, separando-se o licor rico em lignina sulfonada e a fração sólida (PT-BAG2). Para a lavagem, considerou-se a vazão de água igual à de torta produzida, a qual sai do filtro com 50% de umidade. A fração sólida (PT-BAG-2), constituída majoritariamente por celulose e hemicelulose, seguiu para a etapa de hidrólise enzimática e posteriormente para filtração, na qual ocorreu a separação do licor C5C6 da celulignina não hidrolisada. A celulignina não hidrolisada seguiu para queima e geração de vapor/energia. Ao final do processo a cana-de-açúcar hidrolisada foi filtrada, separando-se o licor C5C6 do material não hidrolisado. O licor C5C6 proveniente da hidrólise enzimática da Hierarquia 2G foi concentrado juntamente com o caldo da cana (C6C12) para a realização da fermentação, ou, no caso da cofermentação, o licor C5C6 foi levado para a sub-hierarquia C5C6FERM, onde foi concentrado e fermentado.

Os principais parâmetros adotados na simulação para etapa de pré-tratamento na produção de etanol 2G foram temperatura a 50° C e tempo de reação de 10 minutos (Laurito-Friend et al., 2015) e, em relação à filtração, a eficiência do filtro em relação à retenção dos sólidos insolúveis foi de 99,5% e a perda de sólidos solúveis 2% (Dias et al., 2011) na produção de etanol 2G.

Para dar continuidade ao processo de hidrólise enzimática, a corrente PT-BAG-2 foi misturada com mais duas correntes, de água e enzima, e alimentada no reator de hidrólise (EH-RCT1), que também foi do tipo estequiométrico (Rstoicmodel). Considerou os resultados experimentais de hidrólise enzimático obtidos em reatores de coluna, descrito na Tabela 5.1.

A fração líquida do pré-tratamento, denominada como licor (constituída por lignina sulfonada, água e pequena quantidade de hemicelulose dissolvida), foi encaminhada para a seção de tratamento de efluentes. A palha e parte do bagaço de cana-de-açúcar foram queimados na caldeira visando-se à obtenção de energia elétrica e vapor.

Os principais parâmetros adotados na simulação para a etapa de hidrólise enzimática foram temperatura a 50° C (LAURITO-FRIEND et al., 2015) e teor de sólidos de 9% e 14% (DIAS et al., 2011), considerando os rendimentos de hidrólise da glucana e da xilana obtidos em reator de coluna na parte experimental (Capítulo 3) do trabalho realizado no âmbito desta tese de doutorado (Tabela 5.1). Em relação a filtração, a eficiência do filtro em relação à retenção dos sólidos insolúveis foi de 99,5% e a perda de sólidos solúveis 10% (DIAS et al., 2011).

As simulações foram realizadas para obtenção dos balanços de massa e energia, a partir dos quais foram feitas determinações quantitativas de matérias-primas, consumíveis, utilidades e necessidades energéticas, entre outros, para cada cenário simulado.

5.2.4 Avaliação de viabilidade econômica

A análise de custos foi obtida empregando-se os resultados de balanço de massa e de energia realizados, sendo que a disposição dos dados disponíveis na BVC em planilhas eletrônicas foi a base desta análise. Os preços de cana e palha foram estimados utilizando a plataforma CanaSoft (CARDOSO et al., 2013).

Foram usados dados para as condições brasileiras, incluindo custo de mão de obra, tipos de colheita e plantio, operações agrícolas, maquinários, implementos, agroquímicos, entre outras variáveis, as quais foram incluídas nos cálculos para determinação de variáveis-resposta como a taxa interna de retorno (TIR) e valor presente líquido (VPL), conforme metodologia já empregada no âmbito da BVC (BONOMI et al., 2016). A análise econômica considerou projetos *Greenfield*, ou seja, nos quais as plantas industriais são executadas como um novo projeto, construídas como se não houvesse qualquer infraestrutura ou planta anterior. Desta forma, foi possível realizar uma comparação padronizada entre os cenários. Mesmo estes sendo de processos integrados de produção de etanol 1G2G, não se avaliou a modificação de uma planta 1G preexistente, de modo a comportar somente a tecnologia 2G do cenário que neste caso representaria projetos industriais *Brownfield*.

No que concerne à metodologia para estimativa dos custos de investimentos e à análise econômica, estas foram realizadas conforme descrito no livro de BONOMI et al. (2016), mais especificamente no Capítulo 6, intitulado como *Sustainability Assessment Methodologies* (WATANABE et al., 2016). Esta parte do trabalho ocorreu em parceria com a Divisão de Inteligência de Processos do Laboratório Nacional de Biorrenováveis

(LNBR/CNPEM), sendo utilizados os bancos de dados e metodologias internas desta instituição. Os dados foram analisados e compilados, construindo um modelo de equação em que o valor do investimento necessário ficasse em função do fluxo mássico da corrente (ou de um componente da corrente) de entrada naquela área de produção específica.

A análise financeira foi realizada tendo como base as premissas econômicas mostradas na Tabela 5.3 (BONOMI et al., 2016). Os preços considerados são de séries históricas de uma década para o etanol anidro (CEPEA, 2018). No caso da eletricidade a partir da biomassa, foram considerados os preços de leilões de energia (MME 2013; CCEE, 2018). No caso dos insumos para o pré-tratamento foram considerados os preços da ComexStat (2018). Todos os preços utilizados no cálculo das médias foram corrigidos de acordo com Índice de Preços ao Consumidor Amplo (IPCA), sendo dezembro de 2018 a data de referência para a atualização.

Para a avaliação financeira, foram assumidos cenários de produção verticalizados, nos quais os custos totais de produção da biomassa, calculada utilizando o CanaSoft (BONOMI et al., 2016), refletem os custos de aquisição desta para o processamento industrial.

No presente trabalho, foram calculados os custos de produção de etanol 1G, 2G e 1G2G. Estes, além dos custos com investimentos, foram os principais resultados econômicos para comparação dos cenários avaliados. Também foram calculados os indicadores para definir a viabilidade dos cenários de biorrefinarias, sendo utilizados a taxa interna de retorno (TIR) e o valor presente líquido (VPL).

O custo de produção é composto por dois componentes principais: custos operacionais (OPEX) e de capital (CAPEX). Os custos operacionais estão associados às despesas anuais com matéria-prima, manutenção, trabalho, insumos químicos, entre outros, enquanto nos custos de capital estão todos os equipamentos pertencentes às etapas do processo e instalações auxiliares requeridas. Para compor o custo de produção, este foi calculado com base no pagamento anual que seria necessário remunerar o investimento total a uma taxa de juros de 12% ao ano, assumida ao longo do tempo de projeto (JUNQUEIRA et al., 2017).

Como a biorrefinaria produz mais de um produto, foi aplicado um critério de alocação para custos operacionais e de capital. O custo de produção de etanol foi calculado considerando a alocação de custos anuais globais (custos operacionais e de capital) entre etanol e eletricidade com base na participação nas receitas. Nos cenários integrados 1G2G, foi realizado um passo de alocação adicional entre o etanol 1G e 2G, com base na participação na produção (WATANABE et al., 2016). Neste caso, considerou-se que o etanol 1G tem o mesmo custo nos cenários 1G e 1G2G. Portanto, todos os custos adicionais foram atribuídos ao etanol 2G.

Tabela 5.3 - Premissas econômicas empregadas na análise dos cenários avaliados

Preços de venda	Valor	Referência
Etanol anidro (R\$/KG)	1,85	CEPEA (2018)
		MME (2013); CCEE
Eleticidade (R\$/MWh)	204,38	(2018)
Parâmetros do projeto	Valor	Referência
Data de referência	2018 Novembro	Esse estudo
Taxa mínima de atratividade (a.a.)	12%	Bonomi et al. 2016
Horizonte de tempo do projeto (anos)	25	Bonomi et al. 2016
Taxa de depreciação linear (a.a.)	10%	Bonomi et al. 2016
Custo de manutenção anual (%CAPEX)	3%	Bonomi et al. 2016
Custo da enzima (US\$/kg proteína)	4,24	Humbird et al. (2011)
Preço NaOH (R\$/kg)	2,01	ComexStat (2018)
Preço sulfito (R\$/kg)	1,76	ComexStat (2018)
Capital de giro (% investimento capital fixo)	10%	Bonomi et al. 2016
Custo médio por trabalhador, c/encargos (R\$/mês)	4634	BVC (2018)
Número de trabalhadores 1G2G	301	BVC (2018)
Custo de outros insumos 1G (R\$/TC convecional)	2,56	BVC (2018)
Taxa de câmbio (R\$/US\$)	3,79	BVC (2018)
Alíquota IRPJ+CSLL	34%	Bonomi et al. 2016
Custo do colmo (R\$/TC)	79,48	BVC (2018)
Custo da palha (R\$/tbs)	60,77	BVC (2018)

Fonte: Próprio autor

5.3 Resultado e Discussão

5.3.1 Síntese da hierarquia 2G e integração na simulação 1G2G

No desenvolvimento da hierarquia 2G foram simuladas as etapas de pré-tratamento sulfito alcalino com 5% de NaOH e 10% de Na₂SO₃ e a hidrólise enzimática com tempo de reação de 8 e 24h, simulando-se também as etapas de filtração e cofermentação de pentoses

A simulação foi considerada finalizada quando foi obtida a convergência de entrada e saída, resultando assim nos balanços desejados (GUBICZA et al., 2016). É importante ressaltar que a integração entre os fluxogramas e substituição das conversões de hidrólise pelos valores obtidos em laboratório exigiu uma série de adaptações nas especificações dos equipamentos e na quantidade de vapor direcionada para cada área dentro da biorrefinaria simulada para que houvesse convergência no simulador, que é tipo sequencial-modular. Na biorrefinaria de cana-de-açúcar produz-se a própria energia (térmica e elétrica) necessária para atender a demanda do processo e, sendo as frações lignocelulósicas ao mesmo tempo combustível para produção de energia e matéria-prima para produção de etanol de segunda geração, a convergência apenas é obtida quando o vapor produzido a partir da queima deste combustível atender à demanda de vapor necessária para o processo, que por sua vez depende da quantidade de material lignocelulósico destinado para as unidades de pré-tratamento e hidrólise (DIAS et al., 2013). Vale ressaltar que, com a integração do processo 2G, a produção de eletricidade é reduzida expressivamente, pois todo o material disponível (aquele que excede o necessário para suprir o vapor de todo o processo) é destinado ao processo 2G, em vez de ser utilizado como combustível, consequentemente a produção total (1G2G) de etanol é aumentada.

5.3.2 Produção de etanol e eletricidade nos cenários avaliados

Os resultados de produção de Etanol e de eletricidade dos 8 cenários avaliados estão na Tabela 5.4.

Conforme mostrado na Tabela 5.4, nos cenários avaliados, o rendimento de produção de etanol anidro variou de 46,05 a 53 L/TC e o excedente de eletricidade variou de 33,33 a 43,17 kWh/TC. Analisando cada condição, pode-se observar que houve uma diminuição de 6,5 L/TC na produção de etanol entre os cenários I e VIII; em contrapartida, a eletricidade excedente foi maior no cenário VIII (45,78 kWh/TC). Esses cenários diferenciam-se pelo teor de sólidos, pelo tempo de reação e pela fermentação de pentoses (C5).

Pode-se notar também ao analisar a Tabela 5.4, que entre os cenários de cofermentação I e IV (cenários de cofermentação), o aumento no teor de sólidos de 9% para 14% com o tempo de reação de 24 horas resultou em uma maior quantidade de etanol em relação ao cenário com 9 % de sólidos e com 8 horas de reação de hidrólise (Cenário IV). Isto pode ser explicado pela maior quantidade de polissacarídeos disponíveis quando se processa

maiores teores de sólidos no reator, pois há um aumento na quantidade de carboidratos disponíveis no hidrolisado, levando assim a um aumento na quantidade final de etanol (MODENBACH; NOKES, 2012).

Tabela 5.4 - Produtos das Biorrefinarias simuladas e percentual de bagaço excedente

Cenários	Teor de Sólidos no reator de leito fixo / Tempo de hidrólise	Bagaço Excedente (%)	Etanol Anidro (L/TC*)	Elettricidade Excedente (kWh/TC*)
I	14% / 24h	77	53	33,33
II	14% / 8h	84	50,50	33,40
III	9% / 24h	62	51,49	36,38
IV	9% / 8h	68	48,13	34,30
V	14% /24h	68	48,42	36,95
VI	14% /8h	73	46,80	40,10
VII	9% / 24h	56	48,27	43,17
VIII	9 % / 8h	60	46,05	45,78

*Tonelada métrica de colmo de cana-de-açúcar

Fonte: próprio autor

O interesse no uso de elevada concentração de açúcares no hidrolisado é que há um menor gasto de energia na etapa de concentração, a qual é usual para preparar o meio de fermentação no processamento do etanol 2G visando a aumentar a concentração do produto, favorecendo sua recuperação por destilação (MENDES et al., 2018). Em relação à eletricidade excedente dos Cenários I e IV, houve uma variação de 10% de energia produzida, o cenário III foi o que teve maior produção 36,38 kWh/TC.

Nos cenários de fermentação (Cenários V ao VIII), houve 5% de diferença na produção de etanol quando aumentou o teor de sólidos, a variação na produção de energia entre o cenário V e VIII foi de 8,83 kWh/TC. De uma maneira geral, os cenários de cofermentação produziram maior quantidade de etanol anidro quando comparado com os cenários de fermentação, considerando as mesmas condições, o tempo de hidrólise enzimática

e o teor de sólidos na reação de hidrólise. Comumente, onde ocorre uma maior produção de etanol ocorreu uma menor produção de energia, conforme observado na Tabela 5.4.

5.3.3 Análise da viabilidade econômica dos cenários propostos: custos

A análise econômica dos cenários propostos foi realizada fundamentada nos dados de balanço de massa e energia obtidas a partir dos resultados das simulações.

A princípio os custos de investimento foram avaliados (CAPEX), para fins comparativos, os investimentos foram divididos em dois setores: 1G e 2G. O primeiro setor (1G) agrega as áreas de processamento comumente encontradas nas usinas convencionais de etanol de primeira geração como as etapas de recepção de cana-de-açúcar, da extração e tratamento do caldo, fermentação, destilação e unidade de CHP, além da infraestrutura administrativa e de engenharia, entre outras. Estão incluídos os custos de investimento das áreas comuns usadas tanto para produção do etanol 1G quanto 2G; ou seja, as hierarquias consideradas foram: PREP-EXT, CHP e ETHANOL. Já a parte considerada do etanol 2G engloba apenas as áreas específicas desse processo, como a hidrólise enzimática, pré-tratamento, filtração e concentração.

É importante frisar que nas análises foram considerados os custos de todo o processo e também materiais para a instalação industrial, sendo apresentados assim, na Figura 5.5 os investimentos totais (1G2G) e por setores para cada cenário avaliado (1G e 2G).

Figura 5.5 - Custos de investimento industrial total (1G2G) e por setores (1G e 2G) estimados para cada cenário avaliado com diferentes carregamentos de sólidos no biorreator de hidrólise enzimática e diferentes tempos de hidrólise

Fonte: Próprio autor

A Figura 5.5 apresenta os custos de investimento industrial total (1G2G) e por setores (1G e 2G) estimados para cada cenário avaliado. Conforme mostrado, a biorrefinaria 1G requereu investimento de R\$ 785,50 milhões, enquanto os cenários integrados 1G2G apresentaram valores cerca de 35% superiores.

De fato, segundo o IEA (2010), as plantas de biocombustíveis de primeira geração são menos onerosas em capital em relação às biorrefinarias de segunda geração.

Comparando as condições que diferenciam os cenários, pode-se observar que o uso de 14% de teor de sólidos (Cenários I, II, V e VI) resultou em custo de investimento total (1G2G) relativamente próximo ao obtido com 9% de sólidos (Cenários III, IV, VII e VIII). Na Tabela 5.5 é apresentado o custo de investimento para cada etapa no processo de produção de etanol 1G e para cada cenário de cofermentação avaliado, foi observado que não houve grande variação no custo de produção de etanol, na geração e distribuição de vapor e na

geração e distribuição de energia elétrica. Entretanto, no sistema de água e ar comprimido houve um maior custo nos cenários com maiores teor de sólidos.

A Tabela 5.6 apresenta o custo de investimento para cada etapa no processo de produção de etanol 1G e para cada cenário de fermentação avaliado. Pode-se perceber que, considerando o CAPEX, operar com maior teor de sólidos em modelos de biorrefinaria integrada não resultou em grandes variações no investimento de capital.

Observando os custos de investimentos totais para biorrefinaria 1G2G, houve uma pequena diferença entre cada cenário proposto (Figura 5.5). O cenário III, com 14% de sólidos no reator de hidrólise enzimática, foi o que apresentou maior custo total de investimento (R\$ 1055,89 milhões) e o cenário VI, com 14% de sólidos e 8 horas de hidrólise enzimática, foi o que apresentou menor custo total de investimento (R\$ 923,01 milhões). Ao analisar a Tabela 5.6 é possível observar os fatores responsáveis por essa diferença de valores, os quais incluem as etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação de C5.

Smullen et al. (2017) também relataram que as etapas de pré-tratamento e geração de vapor representam parcelas significativas dos custos de investimento; segundo sua pesquisa, esta etapa representa 20% dos custos totais de produção em processos de conversão de biomassa, sendo considerado o estágio mais dispendioso. Pode-se observar também que os custos de investimento do setor 1G nos cenários 1G2G apresentam uma diferença importante em comparação com a biorrefinaria exclusivamente 1G. Ao observar a Tabela 5.6, percebe-se que essa diferença está ligada principalmente ao custo e geração e distribuição de vapor e energia, que no cenário exclusivo 1G apresenta um custo de R\$225,07 milhões e R\$ 122,28 milhões respectivamente. Nos cenários 1G2G propostos, o custo de geração e distribuição de vapor nos casos de fermentação (tabela 5.6) variou de R\$ 167,24 a R\$ 183,77 milhões e o de energia variou de R\$70,9 a R\$77,2 milhões, enquanto que para os cenários de cofermentação, a variação do custo da distribuição de vapor foi R\$ 182,2 a R\$ 201,4 milhões e o de energia variou de R\$ 66,6 a R\$ 68,7 milhões. Essas diferenças podem ser explicadas considerando que, na produção de bioetanol de primeira geração, todo bagaço e palha disponíveis foram utilizados como combustível em caldeiras, produzindo vapor de alta pressão. O vapor é alimentado em turbinas a vapor de extração-condensação, nas quais se reduz a pressão do vapor para suprir as necessidades térmicas do processo, bem como se produz energia elétrica enquanto o excesso de vapor é condensado.

Tabela 5.5 - Custo de investimento para cada etapa no processo de produção de etanol 1G e para cada cenário de cofermentação avaliado

Etapas 1G (CAPEX milhões R\$)	Cenários de Cofermentação				
	<i>Hidrólise com 14% de sólidos</i>		<i>Hidrólise com 9% de sólidos</i>		<i>Cenário 1G</i>
	I 14% 24 h	II 14% 8h	III 9% 24h	IV 9% 8 h	
Edifícios auxiliares, urbanização e gerais (eng, seg, etc)	138,9	134,7	138,9	132,0	103,3
Recepção e preparo de cana	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2
Extração de caldo	57,2	57,2	57,2	57,2	57,2
Tratamento do caldo	32,7	32,7	32,7	32,7	32,8
Concentração do caldo (1G - açúcar e etanol)	9,7	9,7	9,7	9,7	9,9
Fermentação (C12/C6)	51,0	51,0	51,0	51,0	51,0
Produção de etanol	137,0	130,2	132,7	124,1	104,5
Geração e distribuição de vapor	182,2	186,4	193,9	201,4	225,0
Geração e distribuição de energia elétrica	66,6	66,8	68,7	66,8	122,2
Sistema de água e ar comprimido	70,3	71,6	66,8	68,2	52,0
Subtotal	772,8	767,4	778,8	770,2	785,5

Fonte: Próprio autor

Quando o bioetanol de segunda geração é produzido, o excesso de bagaço e palha é usado como matéria-prima nos processos de pré-tratamento e hidrólise, e, neste caso, o processo determina a quantidade de vapor que é produzida nas caldeiras; assim, turbinas a vapor de contrapressão (sem condensação) são empregadas e, como há maior vazão de bagaço excedente no processo, necessita-se de maior estrutura de edifícios e mais/maiores equipamentos, com maior geração de vapor/eletricidade, aumentando seu custo e elevando o investimento requerido.

Tabela 5.6 - Custo de investimento para cada etapa no processo de produção de etanol 1G e para cada cenário de fermentação avaliado

Etapas 1G (CAPEX milhões R\$)	Cenários de fermentação				
	<i>Hidrólise com 14% de sólidos</i>		<i>Hidrólise com 9% de sólidos</i>		<i>Cenário 1G</i>
	V 14% 24 h	VI 14% 8h	VII 9% 24h	VIII 9% 8 h	
Edifícios auxiliares, urbanização e gerais (eng, seg, etc)	124,9	121,5	126,4	121,2	103,3
Recepção e preparo de cana	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2
Extração de caldo	57,2	57,2	57,2	57,2	57,2
Tratamento do caldo	32,7	32,7	32,7	32,7	32,8
Concentração do caldo (1G - açúcar e etanol)	17,4	19,3	22,6	24,7	9,9
Fermentação (C12/C6)	57,0	55,1	56,4	54,7	51,0
Produção de etanol	126,6	120,7	124,5	118,7	104,5
Geração e distribuição de vapor	167,0	171,2	175,5	183,1	225,0
Geração e distribuição de energia elétrica	70,9	72,9	74,9	77,2	122,2
Sistema de água e ar comprimido	68,2	69,2	65,4	66,3	52,0
<i>Subtotal</i>	749,0	746,9	762,7	762,9	785,5

Fonte: próprio autor

Na Tabela 5.7 são apresentados, individualmente, os custos de investimento necessário para a etapa do setor 2G. Através dos dados da tabela, pode-se observar que o cenário de

maior custo é o número I de cofermentação e o cenário com menor custo de investimento é o VIII de fermentação.

Pode-se observar que os cenários de fermentação são menos onerosos que os cenários de cofermentação, pois não possuem custos de evaporação e fermentação do licor C5. Pode-se observar também de maneira geral que os cenários com maiores teor de sólidos (14%) e com maior tempo de reação (24h) apresentam menor custo na etapa de hidrólise enzimática.

Tabela 5.7 - Investimentos estimados para cada etapa de produção de etanol 2G em cada cenário avaliado

	Cenários de Cofermentação				Cenários de Fermentação			
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
	Etapas 2G CAPEX (milhões R\$)							
Pré-tratamento (com refinador) + tanques insumos	59,48	64,28	48,08	52,73	52,70	56,06	43,72	46,86
Separação s/L após pré-tratamento (licor C5)	37,59	39,52	32,75	34,77	34,76	36,18	30,78	32,20
Hidrólise enzimática	70,07	26,95	86,25	32,34	64,68	21,56	80,85	26,95
Separação s/L após hidrólise (licor C6)	23,05	35,66	21,71	29,77	16,44	28,86	15,32	23,25
Evaporação de licor C5	7,03	9,42	12,83	16,28	0,00	0,00	0,00	0,00
Fermentação (C5)	50,59	42,92	45,59	35,61	0,00	0,00	0,00	0,00
Investimento adicional (tratamento do licor negro)	35,26	37,36	29,68	31,71	31,91	33,52	27,43	28,89
Total	283,6	256,2	276,9	233,2	200,9	176,8	198,1	158,5

Fonte: próprio autor

Além dos custos de capital, foram avaliados nesse trabalho os custos operacionais (OPEX), tais como despesas com manutenção, matéria-prima, enzimas, mão-de-obra, dentre outras. Esses custos são adicionados aos investimentos e alocados entre os produtos da biorrefinaria para determinar o custo de produção de etanol. Os custos de produção de etanol foram calculados com base no procedimento de alocação detalhado em Bonomi et al. (2016). Em primeiro lugar, um cenário separado de uma biorrefinaria 1G cujos principais

produtos são etanol 1G e bioeletricidade é avaliado. Esse processo 1G é simulado para representar o cenário 1G2G antes da introdução do processo 2G. Todas as despesas operacionais e de capital da planta 1G são então alocadas de acordo com a participação do etanol e da eletricidade nas receitas totais.

A Figura 5.6 apresenta o custo total de produção global de etanol (1G2G), do etanol de primeira geração (1G) e do etanol de segunda geração (2G), enquanto a Figura 5.7 (a,b) apresenta a distribuição dos custos de produção de etanol por área para cada cenário, tanto para fermentação quanto para cofermentação.

Figura 5.6 - Custo total de produção global de etanol (1G2G), do etanol de primeira geração (1G) e do etanol de segunda geração (2G).

Fonte: Próprio autor

Para todos os cenários, o custo de produção do etanol de primeira geração foi de R\$1,46. Com relação aos custos do etanol 1G2G, esses variaram de R\$1,80 a R\$1,93 (Figura 5.6). Quando foi considerada a produção global de etanol da biorrefinaria, verificou-se que o menor valor (R\$ 1,80), mostrando que as usinas integradas podem ser viáveis, necessitando de mais estudos de simulação e análise econômica. Quando se considera apenas a biorrefinaria 2G, o valor de etanol foi mais elevado devido ao investimento na construção da planta 2G, ao custo operacional e também ao custo dos insumos químicos. Um estudo realizado pelo LNBR afirmou que o etanol celulósico só vai se tornar economicamente viável para as empresas a partir de 2020. Em simulações realizadas pelo LNBR na Biorrefinaria

Virtual de Cana-de-açúcar (BVC), o custo de produção atual do etanol celulósico é em torno de R\$1,50 por litro, enquanto que para a produção do etanol primeira geração ficou em torno de R\$1,15 (SIAMIG, 2017).

Figura 5.7 - Distribuição dos custos de produção de etanol por área para cada cenário 2G e 1G2G para os cenários de cofermentação (a) e fermentação (b)

Fonte: Próprio autor

Pode-se observar que na distribuição dos custos de produção para os cenários de fermentação (figura 5.7b) e para os cenários de cofermentação (figura 5.7a) de etanol 1G2G por área, o maior é o custo com o reagente sulfito, seguido de custo de investimento de capital e do preço da cana-de-açúcar. Na literatura existem relatos de análise econômica identificando os principais gargalos econômicos. Vasconcellos et al (2019), por exemplo, realizaram a simulação e análise econômica de uma biorrefinaria 1G2G utilizando cana-de-açúcar com as características de um híbrida experimental chamado H89 como matéria-prima e pré-tratamento ácido diluído. Concluíram que, para reduzir o preço de etanol, os esforços devem estar concentrados na superação dos principais gargalos econômicos, como os custos de cana-de-açúcar, capital e insumos químicos. Mendes et al (2018), por sua vez, avaliaram 32 cenários de biorrefinaria integrada de produção de etanol, incluindo diferentes condições de pré-tratamento (alta e baixa severidade), tempo de hidrólise enzimática (24 e 72 h) e destino de pentoses (fermentação a etanol ou descarte). Esses autores utilizaram pré-tratamento sulfito alcalino e diferentes híbridos experimentais de cana-de-açúcar. Foi realizada a simulação de processo e análise econômica para identificar os custos mais onerosos dessas etapas de produção de etanol 1G2G. Os autores concluíram que elevadas cargas do reagente sulfito de sódio foram úteis para aumentar a produção de etanol na biorrefinaria 1G2G. No entanto, o custo do sulfito de sódio foi relevante no custo do etanol 1G2G, sendo necessária uma redução do preço desse reagente para que a biorrefinaria se tornasse viável economicamente.

5.3.4 Taxa interna de retorno (TIR) e Valor presente líquido (VPL) para os diferentes cenários avaliados

A TIR e o VPL são parâmetros econômicos utilizados por um investidor para determinar a viabilidade de um projeto. A análise feita pelo investidor para definir a viabilidade do projeto é a comparação da TIR com a taxa mínima de atratividade (TMA), a qual corresponde ao valor assumido como mínimo aceitável para a realização de um investimento em um dado setor. Caso a TIR seja maior que a TMA, o projeto é considerado adequado para investimento. Para TIR igual à TMA é indiferente investir e, caso seja menor, o investimento deve ser recusado. Há uma relação entre a TIR e o VPL, sendo este maior que zero quando a TIR for maior que a TMA.

A TMA considerada no presente estudo foi 12%; desta forma, observa-se na Figura 5.8 que, para os cenários propostos, a TIR ficou abaixo da TMA.

Figura 5.8 - Taxa interna de retorno (TIR) e valor presente líquido (VPL) para os diferentes cenários avaliados.

Fonte: Próprio autor

No trabalho de Mendes et al. (2018), mencionado na seção anterior, os resultados mostraram que, apesar do aumento da produção de etanol pela integração de biorrefinarias 1G2G, a análise técnico-econômica do processo indicou valores de TIR menores que a TMA (12%). Esses autores realizaram também estudo de análise de sensibilidade paramétrica para avaliar o impacto do preço dos reagentes Na_2SO_3 (1,75 a 7,71 R\$ por Kg de reagente) e NaOH (1,56 a 2,52 R\$ por Kg de reagente) nos valores de TIR dos cenários com melhor desempenho (híbrido H89, pré-tratamento com carga carga severa de NaOH e Na_2SO_3 , 72 h de hidrólise enzimática e co-fermentação de C5eC6). Concluíram que o preço do sulfito foi a variável com maior impacto no valor da TIR; quando o preço mínimo do sulfito foi considerado (1,75 R\$/kg_{reagente}), a TIR foi superior a TMA de 12 % ao ano.

Desta forma, embora os cenários avaliados no presente trabalho estejam inviáveis do ponto de vista do investidor, estratégias como a incorporação de lignossulfonatos ou outros produtos de valor agregado à biorrefinaria poderiam torná-la economicamente mais atrativa.

5.4. Conclusão

- ✓ Com relação aos produtos obtidos nas biorrefinarias analisando cada cenário proposto, pode-se observar que o cenário I de cofermentação com 14% de sólidos e tempo de hidrólise de 24 horas foi o que apresentou o maior volume de etanol anidro (53 L/TC), enquanto que o cenário VIII de fermentação (9% de carregamento de sólidos - 8h de hidrólise) apresentou menor volume de produção de etanol (46,05 L/TC);
- ✓ O cenário VIII de fermentação (9% de carregamento de sólidos - 8h de hidrólise) apresentou a maior quantidade de Eletricidade Excedente (46,75 kWh/TC), enquanto que o cenário VIII apresentou menor quantidade de eletricidade excedente (33,33 kWh/TC).
- ✓ Com relação aos resultados de análise econômica, a biorrefinaria 1G requereu investimento de R\$ 785,50 milhões, enquanto os cenários integrados 1G2G apresentaram valores cerca de 17% a 35% superiores;
- ✓ Ao serem comparados os custos de investimentos para biorrefinaria 1G2G, houve pouca diferença entre cada cenário proposto. O cenário I com 14% de sólidos no reator de hidrólise e 24 horas de hidrólise enzimática foi o que apresentou maior custo total de investimento (R\$ 1055,89 milhões) e o cenário VIII, com 9% de sólidos e 8 horas de hidrólise, foi o que apresentou menor custo total de investimento (R\$ 921,06 milhões);
- ✓ Os custos de investimento do setor 1G nos cenários 1G2G apresentam diferença ao serem comparados com os de uma biorrefinaria exclusivamente 1G; essa diferença está ligada principalmente ao custo e geração e distribuição de vapor e energia, que no cenário exclusivo 1G apresentam um custo de R\$225,07 milhões e R\$ 122,28 milhões respectivamente, enquanto nos cenários propostos o custo de geração e distribuição de vapor variou de R\$ 167,24 a R\$ 183,77 milhões;
- ✓ Os custos do etanol 2G variaram de R\$3,08 a R\$4,78, sendo que o menor valor foi observado para o cenário III (fermentação de C6, hidrólise de 24 horas, 9 % de carregamento de sólidos no reator de hidrólise);
- ✓ Em todos os cenários avaliados, a TIR foi menor que a TMA, indicando a necessidade de estudos adicionais para avaliação de possibilidades como a integração de outros produtos à biorrefinaria.

Referências

ASPENTECH, 2017. Disponível em: <http://www.aspentech.com/products/aspentech-plus.aspx>, Acesso em: 17 mai. 2019.

BONOMI A. et al. **Virtual Biorefinery: An optimization strategy for renewable carbon valorization**. Green Energy and Technology. 1ed.: Springer International Publishing, 2016.

CARDOSO, T. F. et al. Technical and economic assessment of trash recovery in the sugarcane bioenergy production system. **Scientia Agricola**. v. 70, n. 5, p. 353-360, 2013.

CCEE, (2018) Disponível em: <http://www.ccee.org.br/> Acesso em: 22 jan. de 2019.

CEPEA (2018): Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/etanol.aspx> Acesso em: 22 jan. de 2019.

COMEXSTAT (2018): sistema ComexStat. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/> Acesso em: 22 jan. 2019.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **A geração termoelétrica com a queima do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil**. Análise do desempenho da safra 2009-2010. 2011. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_05_15_45_40_geracao_termo_baixa_res..pdf Acesso em: 18 ago. 2015.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, **Cana-de-açúcar** 2016. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/> Acesso em: 20 jun. 2019.

DIAS, M. O. S. **Desenvolvimento e otimização de processos de produção de etanol de primeira e segunda geração e eletricidade a partir da cana-de-açúcar**. 2011. 277 p. (Tese Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.

DIAS, M. O. S. et al. Cogeneration in integrated first and second generation ethanol from sugarcane. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91 n. 8, p. 1411-1417, 2013.

DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; JESUS C. D. F.; ROCHA, G. J. M.; PRADELLA, J.G. C.; ROSSEL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production?. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8964–8971. 2011.

DIAS, M. S.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A.; MACIEL FILHO, R.; ROSSELL, C. V., MACIEL, M. W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane

bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design** v. 87, p. 1206–1216. 2009.

FITZPATRICK, M. et al. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 8915–22, 2010.

FONSECA, G. C. Modelagem e simulação de destilaria autônoma de produção de etanol de primeira geração (1G). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal De São Carlos, 2014.
GAURAV, N., SIVASANKARIB, S., KIRANC, G. S., NINAWEA, A., SELVINB, J. Utilization of bioresources for sustainable biofuels: a Review. **Renew Sust Energ Ver**, v.73, p.205-214, 2017.

HUMBIRD, D.; DAVIS, R.; TAO, L.; KINCHIN, C.; HSU, D; ADEN, A; SCHOEN, P; LUKAS, J; OLTHOF, B.; WORLEY, M.; SEXTON, D.; DUDGEON, D. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol – dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, **Technical Report**. NREL/TP-5100-47764, 2011.

IEA - INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Sustainable production of second-generation biofuels**: potential and perspectives in major economics and developing countries. 2010b. Disponível em: https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/second_generation_biofuels.pdf Acesso em: 02 maio 2019.

JUNQUEIRA, T. L.; CHAGAS, M. F.; GOUVEIA, V. L. R.; REZENDE, M. C. A. F.; WATANABE, M. D. B.; JESUS, C. D. F.; CAVALETT, O.; MILANEZ, A. Y.; BONOMI, A. Techno-economic analysis and climate change impacts of sugarcane biorefineries considering different time horizons. **Biotechnology for Biofuels**, v.10, n. 50, p. 1-12, 2017.

LAURITO-FRIEND, D.F.; MENDES, F.M.; REINOSO, F.M.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Sugarcane hybrids with original low lignin contents and high field productivity are useful to reach high glucose yields from bagasse. **Biomass Bioenergy**, v.75, 65–74, 2015

MACRELLI, S.; MOGENSEN, J.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 22, n. 5, p. 1-18, 2012.

MACRELLI, S; MATS, G.; WALLBERG, O. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. **Biotechnol for Biofuels**, v.26, p.7, 2014.

MARIANO, A. P. et al. Utilization of pentoses from sugarcane biomass: techno-economics of biogas vs. butanol production. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 390-99, 2013.

MENDES, F. M.; DIAS, M. O. S.; Ferraz, A.; MILAGRES, A. M. F.; SANTOS, J. C.; BONOMI, A. Techno-economic impacts of varied compositional profiles of sugarcane experimental hybrids on a biorefinery producing sugar, ethanol and electricity. **Chemical Engineering Research and Design**, v.125, p.72-78, 2017.

MENDES, F. M.; HEIKKILÄ, E. ; FONSECA, M. B.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A. Topochemical characterization of sugar cane pretreated with alkaline sulfite. **Industrial Crops and Products** v. 69, p. 60-67, 2015.

MENDES, F. M.; LAURITO, D. F.; BAZZEGGIO, M.; FERRAZ A.; MILAGRES, A. M. F. Enzymatic Digestion of Alkaline-Sulfite Pretreated Sugar Cane Bagasse and Its Correlation with the Chemical and Structural Changes Occurring During the Pretreatment Step. **Biotechnology Progress**, v. 4, p. 890-895, 2013.

MENDES, F. M.; VASCONCELOS, M. H.; DIAS, M. O. S.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F.; SANTOS, J. C.; CHAGAS, M.; WATANABE, M. D. B.; JUNQUEIRA, T. L.; BONOMI, A. Alkaline sulfite pretreatment for integrated first and second generation ethanol production: A techno-economic assessment of sugarcane hybrids. **Biomass and Bioenergy**, v.119, p.314-321, 2018.

MENDES, F.M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and two experimental samples with reduced initial lignin. **Biotechnology Progress**, v. 27, p. 395- 401, 2011.

MME,(2013) Disponível em:
http://www.mme.gov.br/programas/leiloes_de_energia/menu/leiloes_realizados Acesso em 15 jul. 2019.

MONCADA, J.; GURSEL, V. I.; HUIJGEN, W. J. J.; DIJKSTRA, J. W.; RAMÍREZ, A.; Techno-economic and ex-ante environmental assessment of C6 sugars production from spruce and corn. Comparison of organosolv and wet milling Technologies. **Journal of Cleaner Production**, v.170, p.610-624, 2018.

MONCADA, J.; ARISTIZABAL, V.; CARDONA, C. A. Design strategies for sustainable biorefineries. **Biochemical Engineering Journal**, v.116 p.122-134, 2016.

MONCADA, J.; EL-HALWAGI, M. M.; CARDONA, C. A. Techno-economic analysis for a sugarcane biorefinery: Colombian case. **Bioresource Technology**, v.135, p. 533–543, 2013.

NOVACANA, Biorrefinaria: futuro para o completo aproveitamento da biomassa de cana. Disponível em: <https://www.novacana.com/estudos/biorrefinaria-futuro-para-o-completo-aproveitamento-da-biomassa-de-cana-241013/> Acesso em: 19 abr. de 2019.

QUINTERO, J. A.; CARDONA, C. A. Process simulation of fuel ethanol production from lignocellulosics using aspen plus. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v. 50, n. 10, p. 6205–6212, 2011.

RAICHER, G. Análise econômica na produção de polímeros biodegradáveis no contexto de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar. 2011 (Tese de Doutorado): Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, 2011

RFA. **World fuel ethanol production**. Disponível em: <http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>. Acesso em: 29 mai. 2019.

RIVERA, E. C. et al. A screening design to analyze the influence of technological configurations on techno-economic parameters for autonomous distilleries in Brazil. **Chemical Engineering Transactions**, v. 37, p. 307-312, 2014.

SIAMIG, 2017. Disponível em: <http://www.siamig.com.br/noticias/etanol-de-segunda-geracao-tem-menor-custo> Acesso em: 13 de jul. 2019.

TERÁN-HILARES, R.; et al. A new approach for bioethanol production from sugarcane bagasse using hydrodynamic cavitation assisted-pretreatment and column reactors, **Ultrasonics – Sonochemistry**; v.43, p.219-226, 2018.

TERÁN HILARES, R., IENNY, Y. V., MARCELINO, P.F., AHMED, M.A., ANTUNES, F., DA SILVA, S.S., DOS SANTOS, J.C. (). Ethanol production in a simultaneous saccharification and fermentation process with interconnected reactors employing hydrodynamic cavitation-pretreated sugarcane bagasse as raw material. **Bioresource Technology**. v.243, p.652-659, 2017.

VASCONCELOS, M. H. **Desenvolvimento e análise econômica de modelos de biorrefinaria integrada 1G2G empregando pré-tratamento ácido diluído**, 2017. 97 p (Dissertação de Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, SP, 2017.

WATANABE, M. D. B. Sustainability assessment methodologies. In: BONOMI, A.; CAVALETT, O.; CUNHA, M.P.; LIMA, M.A.P. Virtual biorefinery: an optimization strategy for renewable carbon valorization. Basel: **Springer International Publishing**; 2016, p. 155–88.

WEIFENG, H. et al. Modeling, simulation and optimization of a whole industrial catalytic naphtha reforming process on aspen plus platform. **Chinese Journal of Chemical Engineering** v. 14, n. 5, p. 584-591, 2006.

6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1 Conclusões Gerais

De uma forma geral, o pré-tratamento sulfito alcalino foi eficiente na modificação química do bagaço de cana-de-açúcar, apresentando uma remoção de 56% e 25 % de lignina de hemicelulose, respectivamente, corroborando com os trabalhos anteriores que serviram como base para este projeto.

Nos experimentos de hidrólise enzimática, o primeiro planejamento experimental realizado, com testes conduzidos em frascos Erlenmeyer, foi fundamental na determinação da carga enzimática a ser empregada, indicando a utilização de 16,4 FPU de preparação comercial de celulasas e 4,4 U/g de β -glicosidase por grama de bagaço pré-tratado. Após determinar a condição otimizada para a carga enzimática, o segundo planejamento de experimentos, realizado em reator de leito fixo, resultou na composição de um modelo quadrático para expressar a concentração de xilose no hidrolisado em função das variáveis razão mássica sólido/líquido e vazão de recirculação no reator. A otimização feita para esta variável resposta indicou o uso das seguintes condições: razão sólido/líquido de 14% e vazão de recirculação de 22,7 mL/min, sendo que o modelo previa, nestas condições, a obtenção de 28 g/L de xilose, o que foi confirmado experimentalmente.

A análise da influência do carregamento inicial de sólidos feita em frascos Erlenmeyer e em reator de leito fixo possibilitou obter informações relevantes sobre a influência deste parâmetro no desempenho da hidrólise enzimática. O ajuste de modelos da literatura possibilitou identificar que, em adição ao efeito de inibição por produto verificado nos frascos Erlenmeyer, efeitos de limitações difusionais foram importantes no reator de coluna de leito fixo. Assim, com teor de sólidos no reator elevado de 9% para 16%, efeitos de limitação de transferência de massa resultaram em menor rendimento de hidrólise da celulose, embora com obtenção de maior concentração de açúcares fermentescíveis ao final do processo.

Os processos de fermentação e cofermentação avaliados em configuração SHF exibiram melhor desempenho com taxa de aeração de 0,5 vvm em um reator de colunas de bolhas. Neste sistema, as fermentações com reciclo de células apresentaram desempenho semelhante às realizadas em bateladas simples com a levedura *S. cerevisiae*. Quando a levedura *S. stipitis* foi utilizada nas cofermentações com reciclo de células, o consumo de xilose, a concentração de etanol, a eficiência de fermentação e a produtividade volumétrica

aumentaram ao longo dos ciclos. A fermentação de C6 por *S. cerevisiae* resultou em melhor desempenho no processo em comparação com a cofermentação de açúcares C5C6 por *S. stipitis*, destacando a necessidade de outras estratégias para melhorar esta opção e favorecer a utilização de xilose para a produção de etanol.

Nos experimentos de fermentação e cofermentação simultâneas (SSF/SSCF), a aclimatização progressiva das leveduras *Saccharomices cerevisiae* IR2 e *Scheffersomyces stipitis* NRRL-Y7124 possibilitou seu uso na produção de etanol em processos SSF e SSCF a 40°C. A aeração influenciou na produção de etanol pelas leveduras aclimatizadas em sistemas SSF/SSCF nos processos conduzidos em reator de coluna de bolhas. Para a levedura *S. cerevisiae*, menor aeração favoreceu a produção de etanol, com 15,21 g L⁻¹ de álcool produzidos em 12h de fermentação aerada com 0,3 vvm, correspondendo a 1,27 g L⁻¹.h⁻¹ de produtividade volumétrica. Para a levedura *S. stipitis*, por sua vez, o processo também foi fortemente influenciado pela aeração, cuja variação resultou em modificação nos perfis cinéticos de consumo de açúcares e produção de etanol, indicando a necessidade de mais experimentos para a otimização do consumo de xilose nas cofermentações. A estratégia de hidrólise e fermentação semissimultânea (SSSF) em sistema com alimentação de bagaço por pulsos resultou em 25 g L⁻¹ de etanol, correspondendo a 52 % do potencial teórico de produção do sistema.

O trabalho experimental foi complementado por simulação e análise econômica de diferentes cenários de uma biorrefinaria integrada 1G2G. Com relação aos resultados de análise econômica, a biorrefinaria 1G requereu investimento de R\$ 785,50 milhões, enquanto os cenários integrados 1G2G apresentaram valores cerca de 17% a 35% superiores.

Ao serem comparados os custos de investimentos para biorrefinaria 1G2G, houve pouca diferença entre cada cenário proposto. O cenário I, com 14% de sólidos no reator de hidrólise e 24 horas de hidrólise enzimática, foi o que apresentou maior custo total de investimento (R\$ 1055,89 milhões), sendo que o cenário VIII, com 9% de sólidos e 8 horas de hidrólise, foi o que apresentou menor custo total de investimento (R\$ 921,06 milhões).

Os custos do etanol 2G variaram de R\$3,08 a R\$4,78, sendo que o menor valor foi observado para o cenário III (fermentação de C6, hidrólise de 24 horas, 9 % de carregamento de sólidos no reator de hidrólise). A TIR obtida para os cenários avaliados foi menor que a TMA em todos os casos, indicando a necessidade de avaliação futura de alternativas como a inclusão de outros produtos na biorrefinaria, incluindo, por exemplo, os lignossulfonatos.

6.2 Recomendações para trabalhos futuros

- ✓ Realização de estudos de hidrólise enzimática em processos SHF e SHCF em reatores de coluna com alimentação de bagaço de cana-de-açúcar por pulsos;
- ✓ Avaliar com maior profundidade do efeito da aeração no processo SSCF com a levedura *S. stipitis*, visando à melhoria da produção de etanol a partir de pentoses, incluindo a variação da aeração ao longo do tempo de processo;
- ✓ Integrar outros produtos de maior valor agregado às biorrefinarias integradas 1G2G avaliadas, incluindo, por exemplo, o lignosulfonato, visando a aumentar a taxa interna de retorno (TIR) e favorecer a viabilidade da biorrefinaria proposta;
- ✓ Proceder a estudos de avaliação de sustentabilidade ambiental de biorrefinarias com pré-tratamento sulfito alcalino.