UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FELIPE ANTONIO FERNANDES ANTUNES

Imobilização celular de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 em gel de alginato de cálcio visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado

Lorena

2015

FELIPE ANTONIO FERNANDES ANTUNES

Imobilização celular de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 em gel de alginato de cálcio visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, na área de Concentração: Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Edição reimpressa e corrigida

Lorena

Julho - 2015

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

Antunes, Felipe Antonio Fernandes

Imobilização celular de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 em gel de alginato de cálcio visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado / Felipe Antonio Fernandes Antunes; orientador Silvio Silvério da Silva - ed. reimp., corr. - Lorena, 2015.
169 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientador: Silvio Silvério da Silva

1. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Hidrolisado hemicelulósico. 3. Etanol de segunda geração. 4. Células imobilizadas. 5. Reator de leito fluidizado.
I. Título. II. Silva, Silvio Silvério da, orient.

Dedico esta tese aos meus avôs José Fernandes (*in memorian*) e Antonio Guimarães Antunes (*in memorian*), dois grandes homens que junto as minhas avós conduziram duas famílias no amor de Deus. Para mim, este feito está entre os maiores êxitos de um homem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, ao Nosso Senhor Jesus Cristo, pela força, proteção e sabedoria para o dia-a-dia. A Nossa Senhora, pela intercessão protetora e amor de mãe.

Aos meus pais Roque Antunes e Sandra Antunes, os quais em toda minha vida, independente do momento, tiveram minha educação como prioridade. Agradeço ainda a minha avó D. Cida e minha Tia Eliana, pelo mesmo empenho e ajuda em minha criação. A estes ficam minha gratidão especial, sendo este título um ponto mínimo o qual poderia tentar retribuí-los.

À minha avó D. Rosinha Antunes, uma terna e amável senhora.

À Ana Márcia Antunes, minha esposa. Agradeço a Deus pela minha mulher, fruto dos seus planos, agradeço-o por a ter colocado em minha vida. Todas as realizações só se tornarão completas com ela ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, meu orientador, por toda sua dedicação, ensinamentos e orientações. Agradeço-o principalmente pela confiança depositada em mim, desde os primeiros contatos para a concepção de ideias para este trabalho e pelas oportunidades que concretizaram e fortaleceram a minha formação. A este meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Rosa, por gentilmente ter cedido a levedura utilizada neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Julio César dos Santos, por toda sua atenção, dedicação e motivação tanto profissional quanto pessoal.

Ao Dr. Anuj Kumar Chandel, pesquisador, companheiro de trabalho, o qual tornei-me amigo. Agradeço-o pelos ensinamentos científicos, bem como pela amizade e convivência.

À Profa. Dra. Danielle Julie Carrier, pelo apoio e contribuição com a oportunidade da visita e parceria científica em seus laboratórios na Universidade de Arkansas.

Aos amigos Wagner Freitas, Thaís Milessi e Larissa Brumano, pela amizade e companheirismo em um dia-a-dia tão intenso.

À todos alunos de iniciação científica do laboratório do Prof. Silvio Silvério, e em especial, Daniel Leal, Otávio Danelussi, Vinicius de Paula, Lais Wassano e Guilherme Peres. Obrigado por toda dedicação.

Aos companheiros as quais dividimos o dia-a-dia no laboratório: Rafael, Sabrina, Paulo, Matheus, Bruna, Adriana e Leyanis.

Aos funcionários Nicanor, Paulinho, José Carlos, Isnaldi, Walkiria, Nadir, André e Michelle, os quais sempre foram muito solícitos, além de proporcionarem um bom ambiente de trabalho.

Aos velhos, fiéis e sempre bons amigos Leandro Pereira e Tiago Miquelim,

Ao amigo Zilto Mendes, grande pessoa e profissional.

Aos professores da banca examinadora, pela atenção na leitura e sugestões desta tese;

À CAPES, FAPESP, e CNPq, órgãos cujo apoio financeiro viabilizou este trabalho.

RESUMO

ANTUNES, F.A.F. **Imobilização celular de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 em gel de alginato de cálcio visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado.** 2015. 169 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2015.

Importantes produtos úteis à sociedade podem ser obtidos a partir do bagaço de cana-de-açúcar, como por exemplo, o etanol de segunda geração. Para a produção deste álcool, reforçam-se estudos visando alternativas de processos diferenciados, como por exemplo, utilizando células imobilizadas em biorreatores. O presente trabalho teve como objetivos o estudo de condições de imobilização da levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2, encapsulada em gel de alginato de cálcio, e a avaliação de condições de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, com as células imobilizadas em processos operados em reator de leito fluidizado. Inicialmente, o bagaço de cana-de-açúcar foi submetido à hidrólise ácida seguida de concentração e destoxificação do hidrolisado hemicelulósico. Em ensaios fermentativos em frascos Erlenmeyer, com a nova e promissora levedura fermentadora de pentoses, *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 na forma livre, testou-se diferentes meios nutricionais para a seleção dos nutrientes importantes na suplementação do hidrolisado hemicelulósico. Após análise, escolheu-se o meio composto por 5 g/l de sulfato de amônio, 3 g/l de extrato de levedura e 3 g/l de extrato de malte para as fermentações subsequentes. Utilizando-se este meio, observou-se valores de fator de rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) de 0,38 g/g e 0,19 g/l.h, respectivamente. Em uma primeira etapa, determinou-se as condições de imobilização celular da levedura por encapsulamento em gel de alginato de cálcio, utilizando um planejamento experimental 2^3 completo com três pontos centrais. Avaliou-se a influência da concentração de alginato de sódio, de cloreto de cálcio e tempo de cura, tendo como variáveis resposta $Y_{P/S}$ e Q_P . Pela análise estatística e fermentativa, definiu-se o uso da concentração de 1% de alginato de sódio, 0,2 M de cloreto de cálcio e 12 h de tempo de cura para o processo de imobilização celular. Nesta condição, observou-se valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,32 g/g e 0,14 g/l.h, respectivamente. Posteriormente, conduziu-se fermentações utilizando células imobilizadas em modo de bateladas repetidas em frascos Erlenmeyer, verificando-se a estabilidade na produção de etanol em cinco ciclos fermentativos consecutivos. Em uma segunda etapa, avaliou-se as condições de produção de etanol utilizando células imobilizadas em reator de leito fluidizado, por meio de planejamento experimental 2^2 completo com três pontos centrais. Avaliou-se a influência da vazão de aeração e massa de suporte com células imobilizadas, tendo como variáveis resposta $Y_{P/S}$ e Q_P . A partir da análise estatística e fermentativa, verificou-se como melhores condições para o processo, o uso de 200 g de suporte e 200 ml/min de vazão de aeração. Nestas condições, observou-se valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,26 g/g e 0,17 g/l.h, respectivamente. Sob estas condições de processo, realizou-se também fermentações em modo de bateladas repetidas, verificando-se a estabilidade do sistema operacional de produção de etanol em sete ciclos fermentativos consecutivos. Por estes resultados, concluiu-se que esse processo fermentativo com células imobilizadas em reator de leito fluidizado apresenta destacada potencialidade, podendo servir como conhecimentos para estudos futuros visando a sua implementação em maiores escalas.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, hidrolisado hemicelulósico, etanol de segunda geração, células imobilizadas, reator de leito fluidizado.

ABSTRACT

ANTUNES, F.A.F. **Cell immobilization of *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 in calcium alginate gel aiming ethanol production from sugarcane sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate in fluidized bed reactor.** 2015. 169 p. Thesis (Doctor of Science) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2015.

Important useful products to society can be obtained from sugarcane bagasse, e.g. second-generation ethanol. For the production of this alcohol, studies are focused on alternatives for different processes, e.g., using immobilized cells in bioreactors. This work had as objectives the study of immobilization conditions on the yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2, encapsulated in gel of calcium alginate, and evaluating the conditions of ethanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate, with the immobilized cells in the process carried out in a fluidized bed reactor. Initially, the sugarcane bagasse was subject to acid hydrolysis followed by concentration and detoxification of hemicellulosic hydrolysate. In fermentation tests in Erlenmeyer flasks, with the novel and promising pentose fermenting yeast, *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 in free form, different nutritional media were tested for the selection of important nutrients in the supplementation of hemicellulosic hydrolysate. After the analysis, the medium composed of 5 g/l of ammonium sulfate, 3 g/l of yeast extract and 3 g/l of malt extract was chosen for subsequent fermentations. By using this medium, it was observed values of ethanol yield ($Y_{P/S}$) and volumetric productivity (Q_P) of 0.38 g/g and 0.19 g/l.h, respectively. In a first step, it was determined the yeast cells immobilization conditions by encapsulation in calcium alginate gel using a 2^3 full factorial design with three central points. The influence of the concentration of sodium alginate, calcium chloride and conditioning time was evaluated, with the response variables $Y_{P/S}$ and Q_P . By statistical and fermentative analysis, it was chosen the concentrations of 1% for sodium alginate, 0.2 M for calcium chloride and 12 h for conditioning time in the immobilization process. In this condition, it was observed values of $Y_{P/S}$ and Q_P of 0.32 g/g and 0.14 g/l.h, respectively. Thus, fermentations were performed applying immobilized cells in Erlenmeyer flasks in repeated batch, where the stability of ethanol production in five consecutive cycles was verified. In a second step, the conditions of ethanol production using immobilized cells in fluidized bed reactor were evaluated, by using a 2^2 full factorial design with three central points. In this investigation, the influence of aeration rate and mass of support with immobilized cells was tested, and the response variable were $Y_{P/S}$ and Q_P . By statistical and fermentative analysis, it was found that the best conditions for the process included the use of 200 g of support with immobilized cells and 200 ml/min for aeration rate. Under these conditions, it was observed values of $Y_{P/S}$ and Q_P of 0.26 g/g and 0.17 g/l.h, respectively. Also, under the same conditions, repeated batch fermentations were carried out, where it was verified that ethanol production system stability in seven consecutive fermentation cycles. For these results, it was concluded that this fermentation with immobilized cells in fluidized bed reactor offers outstanding potential and could be used as basis for future studies aiming its implementation in large scales.

Keywords: sugarcane bagasse, hemicellulosic hydrolysate, second-generation ethanol, immobilized cells, fluidized bed reactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição da matriz energética brasileira.....	26
Figura 2 - (A) Exemplo de parte da estrutura química da celulose; (B) Demonstração da ligação de hidrogénio que permite a disposição paralela de cadeias de polímeros da celulose	28
Figura 3 - Exemplo de parte da estrutura química de uma hemicelulose.	29
Figura 4 - (A) Exemplo de estrutura química da lignina; (B) Estrutura dos elementos (1) p-cumaril, (2) coniferil e (3) álcool sinapil.	30
Figura 5 - Distribuição de fonte de energia utilizadas por indústrias brasileiras.....	33
Figura 6 - (A). Divisão da matéria-prima para a produção mundial de etanol; (B) Distribuição percentual da produção mundial de etanol em 2014.....	36
Figura 7 - Produção de etanol no Brasil nas últimas décadas.....	36
Figura 8 - Diagrama esquemático para produção de etanol de primeira geração a partir de cana-de-açúcar.	39
Figura 9 - Diagrama esquemático dos principais processos para produção do etanol de segunda geração, com a solubilização e separação da hemicelulose.....	40
Figura 10 - Pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar.	47
Figura 11 - Geração de produtos e sub-produtos mediante condições de hidrólise ácida. ..	49
Figura 12 - Modelos cinéticos para a conversão de xilanos em xilose e produtos de decomposição por pré-tratamento ácido.	50
Figura 13 - Via metabólica para conversão de xilose a etanol (A) Modelo proposto por Alexander, Yang e Jeffries (1988); (B) Modelo proposto por Kuyper et al. (2004).	59
Figura 14 - Esquema representativo de diferentes métodos de imobilização.....	64
Figura 15 - (A) (1) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos; (2) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos; (3) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e ácidos gulurônicos alternados (B) Permutação de íons de sódio com íons de cálcio em solução gerando a solidificação do alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio	66
Figura 16 - Esquema de um Reator de leito fluidizado (A) Fundo cilíndrico (B) Fundo cônico.....	68
Figura 17 - Esquema de imobilização de células de <i>S.shehatae</i> UFMG-HM 52.2 em matriz de alginato de cálcio.	77
Figura 18 - Reator de coluna Bioengineering (2 l)	81
Figura 19. Diagrama esquemático de etapas da execução deste trabalho	89
Figura 20 - Comparação percentual composicional entre as frações dos principais compostos do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e após o tratamento ácido com ácido sulfúrico.	92
Figura 21- Microfotografias de microscópica eletrônica de varrimento (MEV) da superfície do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (A) e após (B) pré-tratamento ácido. (A1) / (B1), (A2) / (B2), e (A3) / (B3) são referentes a ampliações de 500, 1000, e 5000 vezes, respectivamente.	93
Figura 22. Consumo de açúcares, produção de etanol e biomassa em função do tempo pela levedura <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado por diferentes meios nutricionais. Experimentos foram conduzidos em duplicatas, sendo que o desvio padrão se encontrou abaixo de 5%. Composição do meio A - 5g/l de sulfato de amônio, 3g/l de extrato de levedura, 3g/l de extrato de malte (PAREKH; YU; WAYMAN,1986); Composição do meio B -5g/l de peptona, 3g/l de extrato de levedura, 3g/l de extrato de malte (PAREKH; YU;	

WAYMAN,1986); Composição do meio C - 1,73 g/l de sulfato de amônio, 3,56 g/l de KH_2PO_4 , 2,62 g/l de extrato de levedura (GE et al., 2011); Composição do meio D - 3 g/l de extrato de levedura, 0,25 g/l de Uréia, 0,25 g/l de cloreto de cálcio, 0,25 g/l de sulfato de Magnésio e 2,5 g/l de KH_2PO_4 (SUN;TAO, 2010).....	97
Figura 23. Fator de rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) do processo de fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2 utilizando diferentes meios nutricionais. Os resultados são médias de duplicatas, sendo que o desvio padrão se encontrou abaixo de 5%. Meio 1 - 5g/l de sulfato de amônio, 3g/l de extrato de levedura, 3g/l de extrato de malte (PAREKH; YU; WAYMAN,1986); Meio 2 - 5g/l de peptona, 3g/l de extrato de levedura, 3g/l de extrato de malte (PAREKH; YU; WAYMAN.,1986); Meio 3 - 1,73 g/l de sulfato de amônio, 3,56 g/l de KH_2PO_4 , 2,62 g/l de extrato de levedura (GE et al., 2011) e meio 4 - 3 g/l de extrato de levedura, 0,25 g/l de Uréia, 0,25 g/l de cloreto de cálcio, 0,25 g/l de sulfato de Magnésio e 2,5 g/l de KH_2PO_4 (SUN; TAO, 2010).	98
Figura 24 - Perfil de consumo de açúcares e produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, imobilizada em diferentes condições (de acordo com a Tabela 12).	104
Figura 25 - Gráfico de pareto com as variáveis dependentes fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes (A) Concentração de alginato de sódio, (B) Concentração de cloreto de cálcio e (C) tempo de cura, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^3 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de imobilização de células de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.	105
Figura 26 - Gráfico de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para a variável dependente produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes Concentração de alginato de sódio e tempo de cura (utilizando concentração de 0,2M de cloreto de cálcio), referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^3 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de imobilização de células de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, visando a produção de etanol por a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.	108
Figura 27 - Gráfico de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para a variável dependente produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes Concentração de cloreto de cálcio e tempo de cura (utilizando a concentração de 1% de alginato de sódio),referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^3 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de imobilização de células de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, visando a produção de etanol por a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.	108
Figura 28 - Fotografia de esferas de alginato de cálcio com células de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2	110
Figura 29 - Imagens de microscopia de leveduras de <i>S. shehatae</i> UFMG 52.2 imobilizadas em alginato de sódio. (Aumento de 400x)	112
Figura 30. Perfil da produção de biomassa em forma livre, a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar pela levedura imobilizada <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, em ensaios conduzidos em diferentes condições de imobilização celular (de acordo com a Tabela 12).	113
Figura 31. Perfil de consumo de açúcares e produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar, utilizando a levedura <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2	

imobilizada em matriz de alginato de cálcio com elevada concentração celular (6 g/l de concentração celular em solução de alginato de sódio). O experimento foi realizado em duplicata, sendo que o desvio padrão se encontrou abaixo de 5%.....	115
Figura 32. Valores de fator de rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) para ensaios fermentativos em bateladas repetidas em frascos Erlenmeyer utilizando a levedura <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio, para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar. Os resultados são médias de duplicatas, sendo que o desvio padrão se encontrou abaixo de 5%.....	117
Figura 33. Perfil de consumo de açúcares, produção de etanol e biomassa livre em ensaios fermentativos conduzidos em bateladas repetidas em frascos Erlenmeyer utilizando a levedura <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio, para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.	119
Figura 34 - Perfil de consumo de açúcares e produção de etanol em função do tempo pela levedura <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado, conduzidas em diferentes condições (de acordo com a Tabela 16).....	128
Figura 35 - Gráfico de pareto com as variáveis dependentes fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes (A) vazão de aeração e (B) massa de suporte com células imobilizadas, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^2 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de produção de etanol em reator de leito fluidizado a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando células imobilizadas de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2.	129
Figura 36 - Gráfico de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para a variável dependente fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$), de acordo com resultados das variáveis independentes vazão de aeração e massa de suporte com células imobilizadas, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^2 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de produção de etanol em reator de leito fluidizado a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando células imobilizadas de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2.	131
Figura 37 - Gráfico de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para a variável dependente produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes vazão de aeração e massa de suporte com células imobilizadas, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^2 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de produção de etanol em reator de leito fluidizado a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando células imobilizadas de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2.	131
Figura 38 - Perfil da produção de biomassa em forma livre, a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura imobilizada <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, conduzida em diferentes condições em reator de leito fluidizado (de acordo com a Tabela 16).....	133
Figura 39 - Concentração de biomassa imobilizada por volume de reator em 0 e 96 horas de fermentação, em ensaios fermentativos utilizando a levedura <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio, para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado, conduzidas em diferentes condições (de acordo com a Tabela 16).....	134
Figura 40. Valores de fator de rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) para ensaios fermentativos em bateladas repetidas em reator de leito fluidizado utilizando a	

levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio, para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar.

.....136

Figura 41 - Perfil de consumo de açúcares, produção de etanol e biomassa livre em ensaios fermentativos conduzidos em bateladas repetidas em reator de leito fluidizado utilizando a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio, para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Uso de fonte de carbono provenientes da biomassa vegetal para a produção biotecnológica de diferentes bioprodutos.	27
Tabela 2 - Composição (%) de diferentes resíduos agrícolas e de madeiras	32
Tabela 3 - Diferentes produtos obtidos por via biotecnológica a partir de bagaço de cana-de-açúcar.	34
Tabela 4 - Diferentes tipos de processo para pré-tratamento da biomassa vegetal	42
Tabela 5 - Diferentes métodos de destoxificação de hidrolisado hemicelulósico	52
Tabela 6 - Características dos principais métodos de imobilização de células e enzimas..	62
Tabela 7 - Diferentes composições de meios nutricionais para suplementação do hidrolisado hemicelulósico, visando a produção de etanol por células de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2.	76
Tabela 8 - Níveis codificados e valores reais do planejamento de experimentos 2 ³ para variáveis independentes concentração de alginato de sódio (% m/v), concentração de cloreto de cálcio (M) e tempo de cura (h), no processo imobilização de células de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em frascos Erlenmeyer.	79
Tabela 9 - Níveis codificados e valores reais do planejamento de experimentos 2 ² com três pontos centrais, para variáveis independentes vazão de aeração (ml/min) e massa de suporte com células imobilizadas (g), no processo de produção de etanol por células imobilizadas de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado.	84
Tabela 10 - Composição percentual de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> de diferentes origens.	90
Tabela 11 - Concentrações dos principais constituintes do hidrolisado bruto, concentrado e destoxificado.	94
Tabela 12 - Níveis codificados e valores reais das variáveis independentes (A) concentração de alginato de sódio, (B) concentração de cloreto de cálcio e (C) tempo de cura e resultados das variáveis resposta fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) para cada ensaio do planejamento estatístico 2 ³ completo com três pontos centrais, para estudo de condições de imobilização de células de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	103
Tabela 13 - Análise de variância para as variáveis dependentes fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes (A) Concentração de alginato de sódio, (B) Concentração de cloreto de cálcio e (C) tempo de cura, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2 ³ completo com três pontos centrais, para estudo de condições de imobilização de células de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2, visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.	106
Tabela 14 - Valores de vazão, velocidade, altura de leito, ϵ , $\ln(\epsilon)$, $\ln(U_{tc})$, linearização, U_{tc} e U_{mf} , para carregamento do reator com 100, 150 e 200 g de suporte com células imobilizadas.	122
Tabela 15 - Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) para diferentes condições de vazão de aeração e massa de suporte com células imobilizadas, para produção de etanol por células imobilizadas de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2 em reator de leito fluidizado.	125

Tabela 16 - Níveis codificados e valores reais das variáveis independentes estudadas (A) vazão de aeração e (B) massa de suporte com células imobilizadas; e resultados das variáveis resposta fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) para cada ensaio do planejamento estatístico 2^2 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de produção de etanol em reator de leito fluidizado utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.127

Tabela 17 - Análise de variância para as variáveis dependentes fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes (A) vazão de aeração e (B) massa de suporte com células imobilizadas, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^2 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de produção de etanol em reator de leito fluidizado a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.130

LISTA DE SIGLAS

ε ...porosidade do leito;

ρ_s ...densidade seca da partícula;

A ... área do reator atravessada pelo fluido;

Adp ...absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e hidroximetilfurfural) a 280 nm;

C/C^* ...fração da concentração de O_2 dissolvido em relação à concentração de saturação;

C_f ...concentração de furfural;

C_{HMF} ...concentração de hidroximetilfurfural ;

D_p ...diâmetro médio da partícula ;

ε_{HMF} ...absortividades do do HMF;

ε_F ...absortividades do furfural ;

FBR...*Fluidized bed reactor* (reator de leito fluidizado);

Fr...número de Foudo;

g... grama

h... hora

H...altura do leito;

HPLC... *High performance liquide chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

K_{La} ...coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio;

l... litro

Lk...Lignina Klason insolúvel;

$\log(Ro)$...fator de severidade;

MA...Massa da amostra base, seca;

M_A ... massa de amostra, seca;

M_C ...massa de cinzas;

Mk...Massa seca de lignina insolúvel;

Ms... massa de partículas sólidas;

n... coeficiente de expansão;

Pf...concentração final de etanol;

P_i...concentração inicial de etanol;
Q_P...produtividade volumétrica em etanol;
Q_X...produtividade volumétrica em biomassa;
Re...número de Reynolds;
s... segundos
S_f...concentração final de açúcares;
S_i...concentração inicial de açúcares;
STR....*Stirred tank reactor* (reator de mistura agitado);
T...temperatura de processo;
t...tempo de fermentação;
T_{ref}...temperatura de referência;
U...velocidade superficial do fluido;
U_t...velocidade terminal da partícula;
U_{tc}...velocidade terminal corrigida da partícula;
v_{vm}...volume de ar por volume de meio
V_s...volume do leito de partículas sólidas;
V_t...volume total do reator;
X_f...concentração celular final ;
X_i...concentração celular inicial;
Y_{P/S}...fator de rendimento (ou de conversão) de açúcares em etanol ;
Y_{X/S}...fator de rendimento (ou de conversão) de açúcares em células ;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS.....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	25
2.1.1 Principais constituintes da biomassa vegetal.....	28
2.1.1.1 Celulose	28
2.1.1.2 Hemicelulose	29
2.1.1.3 Lignina	30
2.1.2 Composição de diferentes materiais lignocelulósicos	31
2.2. USO DA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS	32
2.3. O ETANOL NO BRASIL E NO MUNDO	35
2.4 A PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO	38
2.5 O ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	39
2.5.1. A hidrólise da biomassa para a liberação dos açúcares fermentescíveis	40
2.5.1.1 O pré-tratamento ácido da biomassa.....	47
2.5.2 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico	51
2.5.2.1 Detoxificação por <i>overliming</i> e carvão ativo	54
2.6 MICRORGANISMOS FERMENTADORES DE PENTOSE	56
2.6.1 A levedura <i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG-HM 52.2	59
2.7. CONDUÇÃO DE BIOPROCESSOS UTILIZANDO CÉLULAS IMOBILIZADAS	60
2.7.1 Encapsulação em matrizes porosa.....	63
2.7.1.1 Imobilização de células pelo método do aprisionamento em gel de alginato de cálcio.....	64
2.8 PRINCIPAIS BIORREACTORES APLICADOS A CÉLULAS IMOBILIZADAS	66
2.8.1 Biorreator De Leito Fluidizado	67
3. OBJETIVOS.....	71
4. MATERIAL E MÉTODOS	72
4.1 MATÉRIA-PRIMA E PREPARO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO.....	72
4.1.1 Cálculo do fator de severidade ($\log(R_o)$)	73
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E CELULIGNINA	73
4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar	75
4.3 MICRORGANISMO E OBTENÇÃO DAS CÉLULAS	75
4.4 DEFINIÇÃO DE MEIO NUTRICIONAL PARA SELEÇÃO DE NUTRIENTES PARA SUPLEMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO.....	76
4.5 DEFINIÇÃO DE CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR.....	77
4.5.1 Determinação de condições de imobilização celular: Avaliação da influência das variáveis concentração de alginato de sódio, de cloreto de cálcio e tempo de cura nas condições de imobilização celular.....	78
4.5.2 Teste com elevada concentração celular interna nas esferas de alginato de cálcio no processo de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizado células imobilizadas de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2.....	79
4.5.3 Avaliação do desempenho do sistema de bateladas repetidas em frascos Erlenmeyer	80
4.6 DEFINIÇÃO DE CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZADO CÉLULAS IMOBILIZADAS DE <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2 EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO	80

4.6.1 Cálculo da velocidade mínima de fluidização em reator de leito fluidizado	81
4.6.2 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}).....	82
4.6.3 Avaliação da influência das variáveis vazão de aeração e massa de suporte com células imobilizadas.....	83
4.6.4 Avaliação do desempenho do sistema de bateladas repetidas.....	85
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	85
4.7.1 Determinação da concentração celular	85
4.7.2 Microfotografias das células imobilizadas em alginato de cálcio	86
4.7.3 Determinação da variação no diâmetro das esferas de gel de alginato de cálcio	86
4.7.4 Determinação dos teores de açúcares, etanol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural.....	86
4.8 PARÂMETROS FERMENTATIVOS	87
4.9 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE ETAPAS DA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO	88
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR.....	90
5.2 PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO RESULTANTE	92
5.3 SELEÇÃO DE MEIO NUTRICIONAL PARA A LEVEDURA <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2	97
5.4. DEFINIÇÃO DE CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO	102
5.4.1 Avaliação da influência das variáveis concentração de alginato de sódio, de cloreto de cálcio e tempo de cura para a produção de etanol de segunda geração utilizando células imobilizadas de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2 pelo método de aprisionamento em gel	102
5.4.1.1. Teste fermentativo utilizando elevada concentração de células no interior das esferas de alginato de cálcio.....	115
5.4.2 Avaliação do desempenho do sistema em bateladas repetidas em frascos Erlenmeyer	117
5.5.1 Velocidade mínima de fluidização e parâmetros operacionais para uso de células imobilizada de <i>S.shehatae</i> UFMG-HM 52.2 em matriz de alginato de cálcio em reator de leito fluidizado.	120
5.5.2 Avaliação da influência das variáveis vazão de alimentação de ar e massa de suporte com células imobilizadas para a produção de etanol de segunda geração em reator de leito fluidizado utilizando células imobilizadas de <i>S. shehatae</i> UFMG-HM 52.2 pelo método de aprisionamento em gel	124
5.5.2.1 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.....	124
5.5.2.2 Avaliação dos ensaios fermentativos em função das diferentes condições experimentais estudadas.....	126
5.5.3 Avaliação do desempenho do sistema em bateladas repetidas em reator de leito fluidizado.....	135
6. CONCLUSÕES.....	141
7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	143
8. REFERÊNCIAS	144

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

O estudo de tecnologias viáveis de produção de etanol a partir de fontes renováveis é fundamental para o Brasil, tanto pela futura e iminente escassez dos combustíveis fósseis, quanto pela atual política de desenvolvimento sustentável. O etanol, no Brasil, é produzido por meio de uma consolidada tecnologia de primeira geração, a partir de fermentação de açúcares do caldo de cana-de-açúcar. Entretanto, devido à alta demanda da indústria sucroalcooleira, a geração de bagaço de cana-de-açúcar é consequência desta elevada produção, uma vez que o Brasil se apresenta entre os maiores produtores mundiais de etanol combustível, com a produção 2014/2015 estimada em cerca de 27,62 bilhões de litros (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - (CONAB), 2014). Considerando o uso de cerca de 75% do bagaço gerado em sua totalidade para geração de energia (JARDIM, 2007), há ainda um grande excedente deste material, uma vez que a quantidade de cana-de-açúcar moída anualmente é de cerca de 660 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – (CONAB), 2014). O bagaço de cana-de-açúcar, assim como outros resíduos lignocelulósicos, se acumulados no meio ambiente, podem ocasionar sérios problemas ecológicos, como por exemplo, combustão espontânea, alteração de demanda química e biológica de oxigênio em rios, entre outros danos. Neste contexto, ressalta-se o uso deste sub-produto, acoplado a biorefinarias, não só para geração de energia, mas como potencial fonte de carbono para obtenção de etanol e outros produtos, em processos biotecnológicos.

Atualmente, as pesquisas estão reforçadas para obtenção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar, entretanto ainda encontram-se importantes desafios para a viabilização do processo, com rentabilidade para a produção industrial. Entre estes, destaca-se a quebra da estrutura cristalina da fibra do bagaço de cana-de-açúcar de modo a separar os seus principais constituintes, a celulose, a hemicelulose e a lignina. Nesta etapa, faz-se necessário reforçar os estudos, para que, por meio de técnicas mais eficientes, a hemicelulose e a celulose possam ter sua estrutura polimérica fracionada com baixa geração de inibidores e os açúcares obtidos usados como fonte de carbono para os processos biotecnológicos. Atualmente, muitos trabalhos de pesquisa têm sido direcionados ao uso de microrganismos, especialmente leveduras, para a produção de etanol por via fermentativa a partir da fração celulósica do bagaço de cana-de-açúcar. Esta

fração, após o pré-tratamento do material, é normalmente hidrolisada enzimaticamente para sua despolimerização em monômeros de glicose, os quais podem ser convertidos a bioprodutos. Para o uso desses açúcares, encontram-se diferentes microrganismos capazes de convertê-los em etanol, sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* o mais empregado, devido a sua alta eficiência de conversão a etanol. Outra alternativa para a produção, entretanto, menos explorada, é a obtenção de bioprodutos pela fração hemicelulósica, sendo necessários, neste caso, microrganismos assimiladores de açúcares pentoses. Por esta via, é necessária a depolimerização da hemicelulose presente na biomassa, normalmente obtida por catálise ácida a alta temperatura, ou por hidrólise enzimática, com a obtenção de hidrolisado rico em açúcares pentoses. Entretanto, ressalta-se que ainda são poucos os microrganismos conhecidos que exibem a capacidade de assimilar eficientemente estes açúcares. Entre as leveduras com esta característica, destaca-se a nativa *Scheffersomyces stipitis* (HA et al., 2011), entretanto novos estudos devem ser realizados visando à descoberta de novos microrganismos com este evidente potencial, de modo a otimizar processos de fermentação de xilose a etanol. Neste sentido, o Laboratório de Ecologia e Biotecnologia do ICB/UFMG tem apresentado importantes contribuições quanto a seleção destas leveduras da biodiversidade brasileira, de modo que a promissora *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2, isolada a partir de uma amostra de madeira em decomposição, foi gentilmente cedida para o desenvolver o presente trabalho.

O desenvolvimento da tecnologia de produção de bioetanol de segunda geração, no entanto, requer alguns desafios adicionais. Além dos aspectos ligados à matéria-prima e sua hidrólise, avanços tecnológicos tornam a etapa de fermentação susceptível a estudos visando melhoria de desempenho ou até mesmo alternativas diferenciadas. Este é o caso, por exemplo, do uso de reatores de leito fluidizado (FBR - *Fluidized bed reactor*) com células imobilizadas na produção de etanol. Atualmente, em muitos processos biotecnológicos, utiliza-se o reator de mistura ou tanque agitado (STR - *Stirred tank reactor*), conhecido por garantir homogeneidade ao meio reacional por meio do uso de agitadores mecânicos. Entretanto, este tipo de reator pode apresentar alta tensão de cisalhamento gerada pelo agitador mecânico, com possíveis danos e ruptura da estrutura de algumas espécies de microorganismos. Nestes sistemas, também são requeridos altos custos energéticos, com elevada transmissão de potência para funcionamento do mesmo. Neste contexto, o uso do reator de leito fluidizado é uma interessante e promissora

alternativa para uso em bioprocessos. Este reator apresenta características interessantes como: geometria propícia para aumento de escala, e em diferentes configurações; possibilidade de uso de maiores teores de sólidos em relação ao reator de mistura, com alta homogeneidade do meio reacional; facilidade de controle de parâmetros do processo (pH e oxigênio dissolvido) e de retirada de amostra; possibilidade de utilização de partículas com diferentes áreas superficiais específicas; além de não possuir inconvenientes como elevadas tensões de cisalhamento, normalmente impostas ao meio em reatores de tanque agitado mecanicamente (WU et al., 2003; SANTOS, 2005). Ressalta-se que a utilização do reator de leito fluidizado é uma proposta inovadora para a produção de etanol de segunda geração por hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Entretanto, para um melhor desempenho deste reator em bioprocessos, a condução de processo utilizando-se células imobilizadas é uma alternativa de bastante eficácia (PEREZ-BIBBINS et al., 2015). O processo de imobilização celular, onde há o confinamento físico de células em uma região definida de espaço (de modo a manter suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua), possibilita a proteção e principalmente a sua reutilização (COVIZZI et al., 2007). Entre os diferentes métodos de imobilização, destaca-se o encapsulamento em matriz de gel de alginato de cálcio, devido ao caráter não tóxico e simplicidade de processo. A imobilização dos microrganismos para uso no reator de leito fluidizado possibilita ao reator biológico reter grande concentração de biomassa no seu interior devido a maior área superficial, dessa maneira aumentando o contato da biomassa com o substrato e assim elevando a eficiência na produção de etanol. O correto estudo desses e de outros parâmetros, que influenciam em uma melhor eficiência do processo de produção de etanol por via biotecnológica, é fundamental para que seja alcançado maior rendimento e produtividade em etanol, principais desafios para obtenção de etanol de segunda geração.

Considerando-se o contexto atual da busca de viabilização de biorrefinarias empregando a biomassa lignocelulósica, este projeto objetiva avaliar a produção de etanol de segunda geração a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, por via fermentativa, operado em biorreator de leito fluidizado utilizando células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizadas em matriz de alginato cálcio. Este trabalho foi vinculado ao projeto temático “ETANOL: Pesquisa e desenvolvimento visando ao aproveitamento integrado do bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica do

etanol lignocelulósico” (Processo FAPESP 2008/579264) e ao Projeto Universal CNPq, bem como está inserido dentro das linhas de pesquisa “Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais” e “Desenvolvimento de processos fermentativos”, desenvolvidas no Grupo de Microbiologia Aplicada e de Bioprocessos (GMBIO) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Em função do avanço e crescimento das indústrias agrícolas, milhões de toneladas de subprodutos são gerados anualmente, como por exemplo, resíduos agrícolas e florestais como palha de arroz, eucalipto, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, entre outros. Estes materiais, em especial os materiais lignocelulósicos, apresentam um grande potencial como matéria-prima de baixo custo em processos industriais, como por exemplo, para produção de combustíveis, insumos químicos, enzimas, alimentos e bens de consumo diversos, além de geração de energia (LATIF; RAJOCA, 2001). Estes subprodutos, constituintes da biomassa vegetal, se acumulados no ambiente, podem ocasionar problemas de poluição, além de representar a perda de valiosos recursos (CORTEZ, 2010).

Os materiais lignocelulósicos são a mais abundante biomassa renovável, com uma geração anual estimada de 10 a 50 bilhões de toneladas, onde cerca bilhões de toneladas de biomassa primária encontram-se potencialmente acessível para sua reutilização (ZHAO; ZHANG; LIU, 2010).

Atualmente, o Brasil encontra-se em posição destacada quanto ao uso de biomassa em sua matriz energética. De acordo com pesquisa apresentada pelo Balanço Energético Nacional - (BEN) (2014), a biomassa de cana-de-açúcar é a principal fonte utilizada de energia renovável entre a repartição de oferta interna, seguido da energia hidráulica, lenha e carvão vegetal e lixo e outros, conforme apresentado na Figura 1. Entre as principais energias não renováveis, o petróleo e seus derivados seguem como principais fontes, seguidas de gás natural, carvão mineral e urânio.

Segundo o Balanço Energético Nacional - (BEN) (2014), o Brasil utilizou 41% de energia renovável em sua matriz energética em 2013, mantendo-se entre as mais elevadas do mundo, uma vez que a participação de renováveis na matriz energética do resto do mundo e dos países que compõem a OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) foi de apenas 13% e 8,1%, respectivamente.

Figura 1- Distribuição da matriz energética brasileira.

Fonte: Adaptado de Balanço energético nacional - (BEN), (2014).

Entretanto, a geração de biomassa ainda é muito alta, e nem todo seu conteúdo é devidamente utilizado, sendo que seu excedente ainda é da ordem de milhões de toneladas. Sendo assim, é importante que se desenvolvam processos viáveis para o aproveitamento destes sub-produtos lignocelulósicos não só no cenário energético, mas também na obtenção de produtos úteis à humanidade. Desta maneira, o uso destes materiais em processos fermentativos para a produção de diferentes bioprodutos têm sido intensamente estudados. Como exemplos, citam-se alguns trabalhos de pesquisa sobre o uso de fonte de carboidratos provenientes da biomassa vegetal para a produção biotecnológica de diversos bioprodutos, como apresentado na Tabela 1.

O potencial e as características específicas das técnicas para o uso destes materiais relacionam-se intimamente à sua constituição. Os resíduos lignocelulósicos são constituídos basicamente por três frações principais: a celulose e a hemicelulose, formadas por polissacarídeos, e a terceira por um material polifenólico, a lignina (HARMSEN et al., 2009). Além destes constituintes, ainda é possível encontrar pequenas quantidades de pectina, proteína, extrativos e cinzas, sendo que a estrutura destes materiais é considerada bastante complexa (SAHA, 2003).

Tabela 1 - Uso de fonte de carbono provenientes da biomassa vegetal para a produção biotecnológica de diferentes bioprodutos.

Produto	Matéria-Prima	Referência
Butanodiol	Restos de Madeira	GROVER; GARG; VERMA, 1990.
	Caroço de Milho	CHENG et al., 2010.
	Palha de Milho	LI et al., 2014.
Etanol	Bagaço de Sorgo Sacarino	HEREDIA-OLEAA; PÉREZ-CARRILLOA ; SERNA-SALDÍVAR, 2013.
	Bagaço de cana-de-açúcar	CHANDEL et al., 2014; MILESSI et al., 2014.
	Palha de Trigo	SAHA et al., 2015.
	Mandioca	AJIBOLA; EDEMA; OYEWOLE, 2012.
Proteína microbiana	Bagaço de cana-de-açúcar	NIGAM, 2000a.
	Farelo de Arroz	ANUPAMAA; RAVINDRA, 2001.
	Resíduos de abacaxi	DHANASEKARAN et al., 2011.
	Casca de laranja	AZAM et al., 2014.
Xilitol	Bagaço de cana-de-açúcar	SARROUH; SILVA, 2008.
	Bagaço de Caju	GOMES et al., 2014.
	Casca de banana	NADEEM et al., 2012.
Ácido láctico	Sabugo de Milho	GUO et al., 2010.
	Farelo de Arroz	TANAKA et al., 2006.
	Palha de Milho	CUI; LI; WAN, 2011.
Ácido cítrico	Madeira de Eucalipto	PRATA; SANTOS, 2003.
	Palha de Trigo	ZHANG et al., 2014.
	Polpa de Uva	HANG; WOODAMS, 1985.

Fonte: Arquivo pessoal

2.1.1 Principais constituintes da biomassa vegetal

2.1.1.1 Celulose

A celulose é o material orgânico mais abundante na natureza, sendo um polímero linear de alto peso molecular, insolúvel em água, constituído por unidades de celobiose ligadas entre si por ligações β -1,4 glicosídicas, como apresentado na Figura 2A (ROWELL et al., 2005). O número de unidades de glicose em uma molécula de celulose (grau de polimerização) varia de 1000 a 50000, dependendo da origem vegetal (KUHAD; SING, 1993). Em casos de moléculas com alto grau de polimerização, as moléculas de celulose podem agregar-se umas as outras, devido a pontes de hidrogênio (Figura 2B) e microfibrilas, que são os blocos de construção das fibras, e por sua vez, criar a fibra de celulose (SJÖSTRÖM, 1993). A celulose produzida pelas plantas é composta normalmente por regiões altamente amorfas, contendo grandes vazios e outras irregularidades, bem como juntas e regiões cristalinas, consequentes da densidade de sua estrutura composicional. Pela sua estrutura resistente à maioria das formas de degradação, esta pode ser encontrada em abundância no meio ambiente. O grau de polimerização bem como de cristalinidade são fatores significantes no processo de hidrólise da celulose (ZHANG et al., 2004).

Figura 2 - (A) Exemplo de parte da estrutura química da celulose; (B) Demonstração da ligação de hidrogênio que permite a disposição paralela de cadeias de polímeros da celulose

Fonte: Adaptado de Harmsen et al., (2009).

2.1.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é outro polissacarídeo presente na biomassa vegetal, sendo um composto de reserva e sustentação. Esta fração da biomassa é um polímero complexo em termos de componentes e estrutura molecular (HARMSSEN et al., 2009). Este composto é formado por um grupo de polissacarídeos ramificados, constituído principalmente por resíduos de pentoses, hexoses e ácidos urônicos e são classificadas de acordo com o carboidrato predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Entre essas classificações das hemiceluloses, destacam-se as xilanas, galactomananas, arabino-xilanas, arabinoglucurono-xilanas, arabino-4-metil-glucurono-xilana, 4-metil-glucurono-xilanas, galactosanas e galacto-arabino-glucurono-xilana (BIELY, 1985). A hemicelulose também pode conter grupos de substituição acetil e de metil (HAN; ROWELL, 1996; ROWELL et al., 2005; SJÖSTRÖM, 1993).

Na composição dos hidrolisados hemicelulósicos provenientes de materiais lignocelulósicos, encontram-se principalmente compostos como D-xilose, D-manose, D-glicose, D-galactose e L-arabinose, ácido D-glicurônico e ácido D-galacturônico, entre outros. Entre estes compostos, encontram-se a D-xilose em maior proporção, normalmente acima de 95% (KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004).

O grau de polimerização da hemicelulose é menor comparada à celulose, de cerca de 100 a 200, sendo que as moléculas podem ser altamente ramificadas (ROWELL et al., 2005). O tipo mais comum da família de polissacarídeos da hemicelulose encontrada em madeiras duras e gramíneas é a xilana (Figura 3) (HARMSSEN et al., 2009).

Figura 3 - Exemplo representativo de parte da estrutura química de uma hemicelulose.

Fonte: Adaptado de Harmsen et al., (2009).

Devido à combinação de seus açúcares e por apresentar maior parte de estrutura amorfa, a hemicelulose é mais solúvel em água e facilmente degradada em relação a celulose. Nos materiais lignocelulósicos a celulose e lignina estão intimamente ligadas, uma vez que a hemicelulose representa uma ligação entre as suas frações (HAN; ROWELL, 1996).

2.1.1.3 Lignina

A lignina é a terceira principal fração dos materiais lignocelulósicos. Este composto é uma complexa macromolécula polifenólica amorfa composta principalmente por unidades de fenilpropano (p-cumaril, coniferil e álcool sinapil) ligadas entre si por ligações carbono-carbono (HARMSSEN et al., 2009), conforme apresentado na Figura 4.

Figura 4 - (A) Exemplo de estrutura química da lignina; (B) Estrutura dos elementos (1) p-cumaril, (2) coniferil e (3) álcool sinapil.

Fonte: Adaptado de Harmsen et al., (2009).

Junto a celulose, a lignina é um composto de natureza amorfa e insolúvel em água, sendo uma das mais abundantes e importantes substâncias orgânicas poliméricas da biosfera (BRUNOW; LUNDQUIST; GELLERSTEDT, 1999; FENGEL; WEGENER, 1983). Este composto representa em média de 20 a 30% da biomassa lignocelulósica, estando ligado estruturalmente à celulose e hemicelulose, conferindo rigidez e baixa reatividade ao conjunto de fibras dos vegetais, impedindo a degradação da mesma (BRUNOW; LUNDQUIST; GELLERSTEDT, 1999). A lignina aumenta as propriedades de resistência mecânica do vegetal, sendo responsável pela rigidez e verticalidade de plantas e árvores. Além disso, tecidos lignificados resistem ao ataque de microrganismos, impedindo a penetração de enzimas destrutivas no tecido celular, além de oferecer proteção contra o estresse oxidativo (FENGEL; WEGENER, 1983).

Normalmente as ligninas são classificadas de acordo com seus elementos estruturais e existe variação composicional de espécie para espécie. Por exemplo, madeiras duras possuem uma composição percentual de 18% a 25% de lignina, enquanto madeiras moles possuem entre 25 e 35% (ROWELL et al., 2005).

2.1.2 Composição de diferentes materiais lignocelulósicos

A composição exata destes principais constituintes da biomassa não é bem definida, sendo que a proporção entre os mesmos variam de acordo com a espécie vegetal da qual se originaram (KUHAD; SINGH, 1993). Na tabela 2 são apresentados exemplos de composição percentual de diferentes materiais lignocelulósicos.

Esta variação também pode ocorrer entre biomassas individuais da mesma espécie, sendo que fatores como a genética, idade do vegetal, condições climatológicas e geográficas e de crescimento são fundamentais para a relação constituinte entre estes elementos (CANILHA et al., 2012). De fato, a proporção entre a hemicelulose, a celulose e lignina presente na biomassa vegetal exibe uma notável estabilidade química e proteção contra ataque biológico (PRAKASHAM; SREENIVAS; HOBBS, 2009).

Tabela 2 - Composição (%) de diferentes resíduos agrícolas e de madeiras

Resíduo	Componentes					Referências
	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Extrativos (%)	Cinzas (%)	
Bagaço de cana-de-açúcar	43,1	25,2	22,9	4,3	2,8	ROCHA et al., 2012.
Bagaço de Sorgo	40,4	35,5	3,9	n/d	0,2	DOGARIS et al., 2009.
Pó de café usado	8,6	36,7	n/d	n/d	1,6	MUSSATO et al., 2011.
Casca de arroz	21,5	23,1	14,6	n/d	n/d	MEGAWATI et al., 2011.
Palha de Milho	34,4	29,0	17,2	n/d	n/d	BURA; CHANDR; SADDLER, 2009.
Palha de Arroz	43,4	22,9	17,2	n/d	11,4	ROBERTO et al., 2003.
Palha de Cana-de-açúcar	40,8	30,8	25,8	n/d	2,6	MOUTA et al., 2011.
Palha de trigo	36	23,1	18,4	n/d	8,6	SAHA et al., 2015.
Caroço de milho	42,7	34,3	18,4	3,0	n/d	CHENG et al., 2009.
Palha de Cevada	40	20	15	n/d	11	KUHAD; SINGH, 1993.
Casca de Amendoim	38	36	16	nd	5	
Madeira dura	45	30	20	nd	5	
Madeira branda	42	27	28	nd	3	

n/d – não detectado

Fonte: Arquivo pessoal

2.2. USO DA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS

No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é um dos resíduos/subprodutos lignocelulósicos mais abundantes, para os quais novas tecnologias de aproveitamento são necessárias. A produção estimada de cana-de-açúcar a ser moída na safra 2014/15 é de

cerca de 659 milhões de toneladas, valor muito próximo da safra passada, que foi de 658,82 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - (CONAB), 2014). A área cultivada com cana-de-açúcar destinada ao setor sucroalcooleiro na safra 2014/15 é estimada em aproximadamente 9.000 mil hectares. Entre os estados produtores, São Paulo permanece em primeiro lugar, com 51,43% (4.678,8 mil hectares) da área plantada, seguido por Goiás com 9,85% (896,06 mil hectares), Minas Gerais com 8,8% (800,91 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 7,63% (693,77 mil hectares), Paraná com 7,07% (642,98 mil hectares), Alagoas com 4,41% (401,34 mil hectares) e Pernambuco com 2,89% (263,03 mil hectares). Apenas estes estados correspondem a 92,07% da produção nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - (CONAB), 2014). No processamento da cana-de-açúcar são gerados aproximadamente 250 kg de bagaço por tonelada de matéria-prima, sendo que cerca de 75% do total do bagaço gerado é utilizado em caldeiras para geração de energia da própria usina sucroalcooleira (JARDIM, 2009). Segundo dados emitidos pelo Balanço Energético Nacional - (BEN) (2014), o bagaço de cana-de-açúcar encontra-se junto a eletricidade como as maiores fontes de energia nas indústrias (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição de fonte de energia utilizadas por indústrias brasileiras.

Fonte : Adaptado de Balanço energético nacional – (BEN), (2014).

Observa-se que o uso de fontes renováveis se encontra em maior número do que aqueles não renováveis. Além da geração de energia elétrica, o bagaço pode ser utilizado ainda para a produção de outros produtos, como por exemplo, papel e papelão, aglomerados, ração animal e adubo (PANDEY et al., 2000). Entretanto, mesmo com esse

uso, nem todo o bagaço é consumido devido a sua alta geração, e seu excedente, ainda com uma estimativa em milhões de toneladas, pode se acumular de tal forma a ser considerado um problema ambiental, uma vez que seu acúmulo por longos períodos pode desencadear uma combustão espontânea, oferecendo riscos à usina e regiões vizinhas (CORTEZ, 2010).

Vários estudos têm sido desenvolvidos em busca de uma utilização sustentável do bagaço de cana-de-açúcar, que normalmente possui 38-46% de celulose, 19-31% % de lignina e 19-32% de hemicelulose (CANILHA et al., 2012). Por meio de um mecanismo de hidrólise, as frações de carboidratos podem ser separadas e usadas como fonte de carbono para processos biotecnológicos visando a produção de produtos de interesse (CHANDEL et al, 2012). Desta maneira, o bagaço de cana-de-açúcar apresenta um grande potencial como fonte carbono para produção biotecnológica de diferentes bioprodutos, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Diferentes produtos obtidos por via biotecnológica a partir de bagaço de cana-de-açúcar.

Produto	Referência
Proteína Microbiana	NIGAM, (2000a).
Ácido Láctico	MARTINS et al., (2014).
Ácido Cítrico	MAHIN et al., (2012); YADEGARY et al., (2013).
Xilanase	BOCCHINI et al., (2005).
a-Amilase	RAJAGOPALAN; KRISHNAN, (2008).
Poli-3-hidroxibutirato (P3HB)	SILVA et al., (2004).
Xilitol	SANTOS et al., (2005); RAO et al., (2006); SILVA et al., (2007); CARVALHO; CANILHA; SILVA, (2007); SARROUH; BRANCO; SILVA, (2009).
Etanol	CHANDEL et al., (2007); CHENG et al., (2008); MILESSI et al., (2012); FERREIRA et al., (2012); CHANDEL et al., (2014).

Fonte: Arquivo pessoal

Entre estes bioprodutos apresentados, destaca-se estudos e pesquisas para a produção do etanol de segunda geração, utilizando-se como matérias-prima a biomassa

lignocelulósica, proveniente de resíduos da agroindústria, sendo principalmente a partir do bagaço da cana-de-açúcar (BASTOS, 2007). Segundo Jeffries (2006), a fermentação de açúcares pentoses e hexoses presentes nos hidrolisados lignocelulósicos é fundamental para uma produção de etanol mais econômica e sustentavelmente viável.

Desta maneira, com a iminente escassez dos combustíveis fósseis, bem como o aumento da demanda de veículos automotores, este conceito para a produção de biocombustíveis verdes (a partir de fontes renováveis), como por exemplo, o bioetanol, vem ganhando investimento, impulso e espaço significativo como uma estratégia de desenvolvimento sustentável (GOLDEMBERG, 2008).

2.3. O ETANOL NO BRASIL E NO MUNDO

Devido a iminente futura escassez dos combustíveis fósseis, a utilização de diferentes fontes de energia renovável deve ser sustentavelmente eficaz, conveniente e seguro (CHUM; OVEREND, 2001). Desta maneira, o bioetanol se mostra como uma efetiva alternativa como energia renovável. Este álcool quando comparado a gasolina, possui uma pressão de vapor inferior, o que resulta em menores emissões de gases de efeito estufa, possibilitando assim uma melhora na qualidade do ar em áreas metropolitanas (GOLDEMBERG, 2008). Segundo Goldemberg (2006), se o etanol a partir de cana-de-açúcar substituísse 10% da gasolina consumida no mundo, as emissões de carbono poderiam ser reduzidas em até 66 milhões de toneladas por ano. Considerando o cenário mundial, o Brasil em 2011, produzindo e consumindo energia, emitiu em média, 2,1 toneladas de CO₂/habitante, enquanto os Estados Unidos, a União Européia e a China emitiram cerca de 17,0, 7,0 e 6,0 toneladas CO₂/habitante, respectivamente (BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL - (BEN), 2014).

Atualmente, os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais de etanol, com a produção obtida por grãos, seguido pelo Brasil, produzindo-o por caldo de cana-de-açúcar. A divisão da matéria-prima utilizada pelos principais países produtores de etanol, bem como a participação dos maiores produtores deste álcool no cenário mundial são apresentados na Figura 6(A) e(B), respectivamente.

A escala produtiva do etanol brasileiro a partir do caldo de cana-de-açúcar já é uma realidade desde algumas décadas. Em 2014, a produção mundial de etanol foi de cerca de 93007 milhões de litros (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION - (RFA), 2015), sendo

que o Brasil produziu cerca de 27500 milhões de litros (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - (UNICA), 2015).

Figura 6 - (A). Divisão da matéria-prima para a produção mundial de etanol; (B) Distribuição percentual da produção mundial de etanol em 2014.

Fonte: (A): Adaptado de Berg, (2003); (B): Adaptado de Renewable fuels association - (RFA), 2015.

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento - (CONAB, 2014), o primeiro levantamento da safra brasileira 2014/2015 estima a produção em 27,62 bilhões de litros de etanol. A figura 7 apresenta a produção de etanol brasileiro desde 1990 até os dias atuais.

Figura 7 - Produção de etanol no Brasil nas últimas décadas

Fonte: Adaptado de União da indústria de cana-de-açúcar - (UNICA), 2015.

De acordo com a Figura 7, observa-se aumento da produção de etanol no Brasil a partir de 1990, principalmente na década de 2000. A partir de 2010, verifica-se pequenas oscilações na produção, entretanto ainda apresentando valores bem expressivos, se comparados as duas últimas décadas.

Como hoje apenas parte da biomassa contida na cana-de-açúcar é aproveitada para a produção de açúcar e de etanol, o grande desafio é transformar a celulose e a hemicelulose, que está no bagaço e na palha descartada na colheita, em álcool combustível.

A história da consolidada produção de etanol de 1ª geração brasileiro iniciou-se na década de 70, com o projeto Próálcool. Este projeto era um ambicioso programa para produzir grandes quantidades de etanol como um combustível substituto para a gasolina e foi impulsionado devido às condições brasileiras muito favoráveis para o cultivo da cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar é um importante cultivo brasileiro desde o século XVIII, sendo que em 1975, o Brasil já era o terceiro maior produtor mundial, com produção de cerca de 5 milhões de toneladas deste vegetal. Nesta época, durante a crise do petróleo, o açúcar estava passando por longos períodos de baixa no mercado internacional, e desta maneira a decisão de desviar parte da produção da cana-de-açúcar para a produção de etanol foi engajada, considerando a tecnologia disponível para o momento. O Próálcool foi lançado pelo governo brasileiro em duas variantes: utilizar obrigatoriamente 10% de etanol anidro como um aditivo para gasolina, sem a necessidade de alteração nos motores automotivos e a utilização de 100% de etanol hidratado (etanol a 95% + 5% de água), em motores específicos (GOLDEMBERG, 2006). Atualmente, o etanol, é usado no Brasil, em larga escala, como combustível, por meio de dois programas distintos: como álcool hidratado, comercializado via bombas específicas nos postos de abastecimento, em veículos movidos exclusivamente a álcool e em veículos *Flex Fuel*, ou como álcool anidro em mistura obrigatória à gasolina, na proporção de 27 %, desde 15 de fevereiro de 2015 (GOVERNO..., 2015).

Além de consolidada tecnologia de produção brasileira de etanol de primeira geração, pode-se destacar o clima propício e área disponível para plantação de cana-de-açúcar. De acordo com Oliveira (2012), existe uma perspectiva que a produção de cana-de-açúcar chegue a cerca de 969 milhões de toneladas em 2022, produção 45% maior, quando comparado, por exemplo, com dados de 2014.

2.4 A PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO

Atualmente, quase todo o etanol mundial é produzido a partir do caldo da cana-de-açúcar ou grãos ("etanol de primeira geração"), conforme apresentado na Figura 6 (A) (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010.) A produção de etanol de primeira geração a partir de cana-de-açúcar consiste na conversão de açúcares hexose a etanol, processo relativamente simples e geralmente realizado em três etapas (DIAS et al., 2011):

- Liberação de açúcares fermentescíveis da cana-de-açúcar;
- Fermentação de açúcares por microrganismos e;
- Separação e purificação de etanol, geralmente realizada por destilação, retificação e desidratação.

(DIAS et al., 2011)

Neste processo, utiliza-se microrganismos fermentadores de hexoses, dentre os quais o mais empregado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que esta utiliza diretamente a sacarose presente no caldo da cana-de-açúcar. Para os processos que utilizam outras fontes de carboidratos, tais como o amido de milho, empregado na produção do etanol americano, faz-se necessário hidrolisar a matéria-prima com amilases para depolimerizar o polissacarídeo em monómeros de glicose, desta maneira podendo ser convertidos a etanol por ação de microrganismos (CINELLI, 2012).

Na figura 8, é possível visualizar as operações envolvidas para produção de etanol, desde o tratamento da cana-de-açúcar, até a destilação do produto final. A cana-de-açúcar é inicialmente lavada e moída, onde separa-se o caldo e o bagaço. Posteriormente o caldo recebe tratamento e purificação em processos de calagem, decantação, clarificação e concentração. Após este tratamento, o caldo é destinado a dornas de fermentação, sendo posteriormente as células separadas do bioproduto por centrifugação. Em uma última etapa, o álcool é destinado a torres de destilação e retificação, de modo a obter-se o etanol em sua forma comercializável (DIAS et al., 2011).

Figura 8 - Diagrama esquemático para produção de etanol de primeira geração a partir de cana-de-açúcar.

Fonte: Adaptado de Dias et al., 2011.

2.5 O ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

O etanol obtido a partir de materiais lignocelulósicos (bioetanol, chamado etanol de 2ª geração) é um combustível renovável produzido a partir de resíduos e sub-produtos agroindustriais, como o bagaço de cana-de-açúcar. O processo para sua produção pode ser dividido em etapas fundamentais (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010), como:

- Pré-tratamentos para tornar os açúcares da hemicelulose e celulose acessíveis a bioconversão pela ação de microrganismos;
 - Fermentação destes açúcares disponíveis;
 - Separação e purificação de etanol.
- (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010)

A figura 9 apresenta um diagrama esquemático dos principais processos para produção do etanol de segunda geração a partir de bagaço de cana-de-açúcar, com exemplo da solubilização e separação da hemicelulose.

Figura 9 - Diagrama esquemático dos principais processos para produção do etanol de segunda geração, com a solubilização e separação da hemicelulose.

Fonte: Adaptado de Cadorna; Quintero; Paz, (2010).

Destaca-se que o produto obtido a partir de bagaço de cana-de-açúcar possui as mesmas características daquele fabricado a partir do caldo da cana-de-açúcar em processo industrial, sendo que na etapa final, ambos os líquidos provenientes das diferentes rotas para a produção de etanol de segunda geração são destinados as torres de destilação e retificação, para obter o álcool em sua forma comercializável.

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica pode aumentar a produtividade de etanol por hectare de cana-de-açúcar plantada (CERQUEIRA LEITE et al., 2009). Considerando-se o processo para a produção de etanol de segunda geração, o bagaço de cana de açúcar é encontrado na literatura como um dos materiais lignocelulósicos mais utilizados como fonte de carbono em pesquisas no Brasil (FERREIRA et al., 2011; MILESSI et al., 2012; CHANDEL et al., 2013; MILESSI et al., 2014).

2.5.1. A hidrólise da biomassa para a liberação dos açúcares fermentescíveis

O pré-tratamento é a primeira etapa para produção do etanol de segunda geração. A recalcitrância do bagaço de cana-de-açúcar é considerada um desafio para a despolimerização da holocelulose (celulose + hemicelulose) em seus constituintes monoméricos, como por exemplo, glicose, xilose, arabinose, entre outros. Os açúcares, quando liberados e disponíveis, podem ser utilizados como carboidratos fermentescíveis

para conversão em etanol ou outros produtos biológicos de importância comercial por fermentação microbiana (KRISHNAN et al., 2010). Após a etapa de pré-tratamento, emprega-se microrganismos adequados a cada tipo de carboidrato disponível para a sua conversão em etanol.

Para o uso da fração celulósica da biomassa em bioprocessos, normalmente é realizada a hidrólise enzimática, processo a qual sua estrutura polimérica é clivada em monômeros de glicose. Para que esta despolimerização ocorra, é necessária a ação de três classes de enzimas celulolíticas (celulases), sendo (i) Endo β -1,4-glucanases (atua nas regiões de baixa cristalinidade da fibra de celulose, permitindo a criação de cadeias de extremidades livres), (ii) Celobiohidrolases ou Exoglucanase (degrada moléculas de cadeias de extremidade livres liberando moléculas de celobiose) e (iii) β -glucosidases (hidrolisam celobiose, liberando monômeros de glicose) (CANILHA et al., 2012).

Quanto ao uso da fração hemicelulósica em bioprocessos, observam-se poucos estudos em relação a celulósica, uma vez que os microrganismos fermentadores de açúcares pentoses já identificados apresentam-se em número bem menor em relação aos que utilizam hexoses como fonte de carbono. Entretanto, evidencia-se a importância e o potencial uso da hemicelulose em bioprocessos, uma vez que este polímero heterogêneo pode representar cerca de 25 à 35% da constituição da biomassa (JOSHI et al., 2011). Para o uso da hemicelulose presente na biomassa, normalmente hidrolisa-se esta fração em um composto líquido hemicelulósico rico em açúcares pentoses. Entretanto, durante alguns tipos de pré-tratamento para obtenção deste hidrolisado, alguns compostos indesejáveis a fermentação (inibidores) podem se formar, tornando necessário sua remoção em um processo posterior, denominado destoxificação (Ítem 2.5.2). Além do método da solubilização da hemicelulose por meio de tratamento termoquímico, uma outra estratégia, é a depolimerização por meio de tratamento enzimático. Uma vez que as xilanas presentes na hemicelulose são heteropolissacarídeos, a clivagem deste polímero em açúcares monoméricos requer uma combinação de enzimas, como endo e exo-xilanases, mananases, β -xilosidase, α -glicoronidase e α -arabinofuranosidase. Esta degradação pode ocorrer de forma aleatória, com a liberação de heteroxilo-olissacarídeos lineares e ramificados (BIELEY, 1985). Entre as principais classes de enzimas degradadoras de hemicelulose, ressalta-se a 1 $\rightarrow$ 4- β -D-xilanase, o qual é a principal constituinte do sistema xilanolítico. Esta enzima degrada o polissacarídeo β -1 $\rightarrow$ 4-xilano em xilose (CANILHA et al., 2012).

Existem vários métodos de pré-tratamentos da biomassa, entre eles físicos, químicos, biológicos, bem como combinações dos mesmos, para a desfragmentação, despolimerização e obtenção de açúcares fermentescíveis das frações da celulósicas e hemicelulósicas da biomassa vegetal. A Tabela 4 apresenta características desses tipos mais empregados de processos, enquanto o pré-tratamento ácido, processo utilizado neste trabalho, é apresentado em maiores detalhes no item 2.5.1.1.

Tabela 4 - Diferentes tipos de processo para pré-tratamento da biomassa vegetal

Pré- tratamento	Características
Moagem	A moagem é um pré-tratamento mecânico que rompe a estrutura de materiais lignocelulósicos e diminui a cristalinidade da celulose. Neste pré-tratamento não é gerado subprodutos indesejáveis, tais como furfural e fenólicos. Uma desvantagem da moagem é a alta energia requerida pelas máquinas e, consequentemente, elevados custos energéticos (SILVA et al., 2010).
Pirólise	Este processo consiste na rápida degradação da celulose em H ₂ , CO e resíduos de carbono por meio do tratamento do material lignocelulósico a temperaturas superiores a 300°C. Esta temperatura elevada libera materiais voláteis, que seguidamente por condensação procede reações autocatalíticas de pirólise (KUMAR et al., 2009). O carvão residual é lixiviado com água ou com um ácido, e o líquido resultante é constituído principalmente por glicose, oferecendo fonte de carbono suficiente para o crescimento microbiano e conversão a bioprodutos (SARKAR et al., 2012).
Microndas	O pré-tratamento por microndas utiliza a interação direta entre um objeto e um aquecimento eletromagnético aplicado, gerando alta eficiência de aquecimento e de fácil operação (HU; ZEN, 2008; BINOD et al., 2012). Uma das principais vantagens desta técnica é a promoção de reações de baixo tempo e de um aquecimento homogêneo da mistura de reação (BALCU et al., 2011). O processo de irradiação de microndas age sob a estrutura da celulose modificando-a, com o aumento da susceptibilidade enzimática (LU et al., 2011).

Continua

Continuação	
Pré- tratamento	Características
Explosão a vapor	A explosão a vapor é descrita como um processo termoquímico, onde a estrutura de divisão de compostos ocorre pela adição de calor na forma de vapor pressurizado (CHORNET; OVEREND, 1998). Neste processo, a mistura de biomassa e de vapor é mantida a altas temperatura em um reator para promover a hidrólise da hemicelulose, seguida por uma rápida descompressão para finalizar a reação (GLASSER; WRIGHT, 1998; AGBOR et al., 2011). No momento da evaporação da umidade condensada, ocorrem muitos fenômenos químicos e a liberação de compostos devido ao vapor, onde se evidenciam a quebra da matriz de biomassa lignocelulósica e a solubilização da hemicelulose (MOSIER et al., 2005).
Explosão com Amônia	O tratamento de explosão com amônia é um método alcalino térmico de exposição do material lignocelulósico a altas temperaturas e pressão em presença de amônia líquida, seguido por uma rápida descompressão. Os açúcares fermentescíveis não são diretamente liberados, entretanto, a estrutura do material é alterada, o que resulta em maior digestibilidade, permitindo que os polímeros possam ser mais facilmente degradados por enzimas hidrolíticas (KUMAR et al., 2009; SARKAR et al., 2012).
Explosão com CO ₂	A explosão com CO ₂ ocorre de forma semelhante a uma explosão com amônia, porém baseia-se no fato do CO ₂ carbônico aumentar a taxa de hidrólise da biomassa (SUN; CHENG, 2002). Este método apresenta o rendimento de conversão mais elevado do que o método de explosão de vapor, além de apresentar menor custo que a explosão com amônia. Este processo não provoca a formação de inibidores, em vista que não é necessário o uso de altas temperaturas para a hidrólise (HAMELINCK, HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; KUMAR et al., 2009).

Continua

Continuação	
Pré- tratamento	Características
Água Quente	Este método utiliza água quente sob alta pressão em contato com a biomassa para hidratação da celulose e remoção de parte da hemicelulose e lignina. Uma das principais vantagens deste processo é de não ser necessário a utilização de produtos químicos e reatores de hidrólise de alto custo. Normalmente neste processo, a água quente é mantida em contato com a biomassa a uma temperatura de 200°C -230°C por cerca de 15 minutos, onde cerca de 40% a 60% do total da biomassa é dissolvida, com remoção de parte da hemicelulose. (MOSIER et al., 2005).
Alcalino	O pré-tratamento alcalino é um processo de deslignificação, em que se empregam bases em contato com a biomassa, como o hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, hidróxido de potássio, solução aquosa de amônia, hidróxido de amônia, hidróxido de sódio e, em combinação com peróxido de hidrogénio ou outros (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). O mecanismo de ação da hidrólise alcalina é de saponificação de ligações éster de reticulação intermolecular de xilanas da hemiceluloses (SUN; CHENG, 2002). Este processo utiliza temperaturas e pressões mais baixas do que outras tecnologias de pré-tratamento, entretanto o tempo hidrólise é considerado maior. Este método é característico por aumentar a área superficial, diminuir o grau de polimerização, diminuir a cristalinidade, separar as ligações estruturais entre a lignina e os hidratos de carbono, e quebrar a estrutura de lignina presente na biomassa (ZHENG, PAN; ZHANG, 2009; SARKAR et al., 2012; RABELO et al., 2014).
Deslignificação Oxidativa	Neste processo a lignina é degradada pela enzima peroxidase na presença de H_2O_2 (SUN; CHENG, 2002). A deslignificação oxidativa é um método que apresenta sucesso em operações de fluxo contínuo para elevadas cargas de biomassa e carga baixa de H_2O_2 . Este processo ainda é um método relativamente não muito explorado em comparação a outros pré-tratamentos termoquímicos (BANERJEE et al., 2011).

Continua

Continuação	
Pré-tratamento	Características
Ozonólise	<p>O ozônio é um poderoso oxidante, solúvel em água e altamente reativo com compostos que incorporam ligações duplas conjugadas e os seus grupos funcionais, podendo ser utilizado para degradar a lignina e a hemicelulose em diferentes materiais lignocelulósicos, tais como palha de trigo, bagaço, palha verde, palha de algodão, entre outros (KUMAR et al., 2009). Neste pré-tratamento, a lignina é oxidada devido ao seu alto teor de ligações carbônicas duplas ($C = C$) (GARCÍA-CUBERO et al., 2010). Este processo não gera resíduos tóxicos, além das reações serem realizadas à temperatura e pressão ambientes (VIDAL; MOLINIER, 1988). A desvantagem é a grande quantidade de ozônio necessária, desta forma elevando o custo do processo.</p>
Organosolventes	<p>Este método baseia-se no processo simultâneo de hidrólise e de deslignificação de materiais lignocelulósicos catalisados por organosolventes e uma solução de ácido diluído (CANILHA et al., 2012). Ao utilizar-se um ácido orgânico forte como catalisador, a lignina é decomposta, (HOLTZAPPLE; HUMPHREY, 1984) aumentando a área superficial e possibilitando melhor acesso enzimático, para obtenção de açúcares fermentáveis (KOO et al., 2011).</p>
Oxidação Úmida	<p>O processo de oxidação por via úmida (<i>wet oxidation</i>) é utilizado para hidrolisar materiais lignocelulósicos e usar a fração de celulose para a sacarificação enzimática (ALVIRA et al., 2010). Este pré-tratamento ocorre na presença de oxigênio ou ar catalisado, sendo o carbonato de sódio o catalisador mais empregado (CARVALHEIRO; DUARTE; GIRIO, 2008). Este processo é considerado de alto custo devido a alta pressão necessária no processo (CARVALHEIRO; DUARTE; GIRIO, 2008). No entanto, uma vantagem deste método é a sua combinação com álcalis em que é possível obter-se açúcares sem geração de furfural e 5-hidroximetilfurfural, compostos indesejáveis para fermentações (BJERRE et al., 1996).</p>

Continua

Conclusão

Pré- tratamento	Características
Líquidos Iônicos	Este método tem recebido atenção no pré-tratamento de frações da biomassa, principalmente da celulose, uma vez que líquidos iônicos apresentam forte plasticidade e boa estabilidade térmica. O composto cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ([Bmim] Cl), por exemplo, age como solvente em virtude da formação de ligações de ponte de hidrogênio entre grupos hidroxila da celulose e íons cloreto (DONG; ZHANG, 2012). Normalmente, os líquidos iônicos utilizados em pré-tratamentos possuem como base imidazoles, piridinas, trietanolamina e trietilaminas (ZHUO et al., 2015).
Fluídos supercríticos	Este processo baseia-se em que determinados fluídos, em condições supercríticas, podem penetrar melhor no tecido da biomassa, aumentando a eficiência do pré-tratamento (GAO et al., 2010). Como exemplo, ressalta-se o uso de dióxido de carbono supercrítico (scCO ₂), uma vez que o mesmo pode ser utilizado com eficácia em processos em temperaturas moderadas, gerando menos compostos degradados e indesejáveis (PHAN; THAN, 2014).
Tratamento Biológico	O pré-tratamento biológico é a modificação da composição química e/ou estrutura de materiais lignocelulósicos utilizando microrganismos como bactérias e fungos degradadores de madeira (ZHENG; PAN; ZHANG, 2009). Este método proporciona a degradação da lignina e hemicelulose da biomassa tornando-a mais acessível a digestão enzimática (SARKAR et al., 2012). A degradação da biomassa é obtida por meio da ação de enzimas de degradação tais como peroxidases e lacases (KUMAR et al., 2009). Este pré-tratamento é considerado ambientalmente correto, devido ao seu baixo consumo de energia e condições amenas de processo (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAALJ, 2005). No entanto, a baixa eficiência, a perda considerável de carboidratos ao longo do tempo de residência e o rígido controle do processo quanto as exigências dos microrganismos ainda são características que restringem suas aplicações. (HUANG et al., 2011). Além disso, os microrganismos podem solubilizar e consumir os próprios açúcares liberados (ZHENG, PAN; ZHANG, 2009).

Fonte: Arquivo pessoal

2.5.1.1 O pré-tratamento ácido da biomassa

Entre todos os tipos de pré-tratamentos químicos, a hidrólise ácida é relatada como um dos métodos mais tradicionais, devido a sua eficiência de remoção de grande parte de açúcares pentoses presentes na biomassa (MUSTAFA, 2011). Neste pré-tratamento, por meio do contato da biomassa com ácido diluído sob condições de temperatura elevada ou ácido concentrado sob baixa temperatura é possível promover a hidrólise da fração de hemicelulose (MOSIER et al., 2005), como apresentado na Figura 10. A partir desta hidrólise são liberados açúcares como xilose, arabinose e manose e em menor proporção, a glicose, sem afetar significativamente a celulose e a lignina (ALVIRA et al., 2010).

Figura 10 - Pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Adaptado de Chandel et al. (2012).

Empregando-se ácido sulfúrico concentrado a temperatura amenas, é possível separar o hidrolisado hemicelulósico e uma parte sólida rica em celulose e lignina (celulignina) (CARVALHEIRO; DUARTE; GIRIO, 2008). Uma vantagem deste processo é o seu uso a baixas e médias temperaturas (MUSTAFA, 2011) e, em consequência, obter redução de custos de energia. Por outro lado, em concentrações elevadas de ácido podem ocorrer problemas como a corrosão do equipamento e os altos custos de manutenção, além da liberação de resíduos após a hidrólise, que devem ser devidamente tratados, por serem fontes poluidoras (ALVIRA et al., 2010). Após esta etapa, é necessário neutralizar o

hidrolisado antes do processo de fermentação, pois o mesmo se encontra altamente ácido e em pH não desejável a processos fermentativos (MOSIER et al., 2005).

Neste sentido, a hidrólise ácida utilizando ácidos diluídos ainda é um dos métodos mais empregados para a decomposição da estrutura lignocelulósica e a liberação de açúcares pentoses, uma vez que os carboidratos provenientes desta hidrólise podem ser utilizados em vários processos de bioconversão (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998; CHENG et al., 2008). Entretanto, durante o pré-tratamento ácido, muitos subprodutos são gerados a partir da degradação dos açúcares liberados. Sob as severas condições do pré-tratamento, frações da biomassa podem ser convertidos em inibidores fermentativos como: furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF)), fenólicos, ácidos fracos (ácido acético, ácido levulinico, ácido fórmico, etc); extrativos das matérias-primas, (resinas ácidas, ácidos tânicos e ácidos terpênicos); íons de metais pesados (ferro, crômio, níquel e cobre) (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000a; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000b).

A figura 11 apresenta a geração destes compostos mediante condições de hidrólise ácida.

O ácido sulfúrico (H_2SO_4) é o reagente químico mais utilizado na hidrólise ácida (MOSIER et al., 2005; WENCHAO; SHEN; WEN, 2015), entretanto, também se encontra na literatura trabalhos utilizando outros ácidos tais como o clorídrico (LAOPAIBOON et al., 2010), fosfórico (CARVALHO et al., 2004), nítrico (RODRIGUEZ-CHONG et al., 2004), oxálico (CHANDEL et al 2013), entre outros. As condições de processo geralmente são realizadas a temperaturas entre 120 a 180 °C em tempo de retenção na ordem de minutos (ALVIRA et al., 2010).

Figura 11 - Geração de produtos e sub-produtos mediante condições de hidrólise ácida.

Fonte: Adaptado de PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, (2000b); CHANDEL, SILVA e SINGH, 2011.

Para a investigação da eficácia deste pré-tratamento, fatores como temperatura, tempo de reação e concentração de ácido deve ser considerados (KAPDAN; KARGI; ÖZTEKIN, 2011). Overend e Chornet (1987) apresentam uma equação envolvendo a temperatura e tempo de reação, de modo a obter-se um indicativo do fator de severidade do processo (Fator de severidade - CS = $\log R_0$, (SCORDIA et al., 2010)). A Equação 1 apresenta esta relação.

$$R_0 = t \cdot e^{[(T - T_{ref}) / 14,75]} \quad (1)$$

Onde: t é o tempo de residência em minutos;

T é a temperatura do processo em °C;

T_{ref} é a temperatura de referência, usualmente ajustado para 100 ° C.

Autores consideram o resultado de $\log(R0)$ como um parâmetro que pode ser utilizado para estudar e definir as condições otimizadas de parâmetros experimentais necessários para o pré-tratamento (GARROTE; DOMINGUEZ; PARAJO, 1999).

Uma variedade de modelos cinéticos para a hidrólise ácida da hemicelulose são descritos na literatura. O modelo mais simples para a hidrólise de xilana envolve uma série de reações irreversíveis do estado sólido da xilana em xilose aquosa e, em seguida, para os produtos de decomposição (Figura 12, A) (LAVARACK; GRIFFIN; RODMANN, 2002). Entretanto, este esquema é considerado incompleto, uma vez que a conversão da xilana em xilose não pode ser considerado em um único passo. Neste contexto, a decomposição da cadeia de xilana é descrita, segundo a literatura, como uma decomposição da cadeia de xilana em xilo-oligossacáridos, em seguida, em monômeros de xilose. Este açúcar então é decomposto em furanos e em seguida a outros produtos, conforme apresentado no modelo cinético da Figura 12. Esta decomposição é considerada como um somatório de duas reações de primeira ordem em paralelo, sendo caracterizadas como uma reação de hidrólise rápida (fácil de hidrolisar) e uma lenta, conforme apresentado no modelo cinético da Figura 12 (B) (difícil de hidrolisar) (LAVARACK; GRIFFIN; RODMANN, 2002). A literatura também apresenta uma representação onde o furfural é considerado o principal produto de decomposição, conforme apresentado no modelo cinético da Figura 12 (C) (LAVARACK; GRIFFIN; RODMANN, 2002). Em todos os modelos propostos, assumem-se reações de primeira ordem (LAVARACK; GRIFFIN; RODMANN, 2002).

Figura 12 - Modelos cinéticos para a conversão de xilanos em xilose e produtos de decomposição por pré-tratamento ácido.

Fonte: Adaptado de Lavarack, Griffin e Rodmann, (2002).

2.5.2 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico

Tanto a fermentação quanto o crescimento celular podem ser afetados pelos compostos inibidores gerados durante a hidrólise ácida. Para o uso do hidrolisado hemicelulósico ácido em fermentações, uma etapa de destoxificação se faz necessário para remoção destes compostos (LAOPAIBOON et al., 2010).

Os compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural são relatados por autores como inibidores potentes de enzimas chaves tais como álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase e piruvato desidrogenase, dificultando assim a conversão de carboidratos em etanol (MODIG; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002). Entretanto, outros autores descrevem que o efeito tóxico dos compostos furanos é pelo fato de serem aldeídos quimicamente reativos, onde a reação com moléculas biológicas pode ocasionar danos à membrana celular (MILLER et al., 2010). Estes compostos são característicos em reduzir a taxa de crescimento específico, o fator de rendimento celular em biomassa e a produtividade volumétrica de etanol.

Os ácidos levulínico, fórmico e acético estão normalmente presentes em hidrolisados hemicelulósicos. O efeito inibitório destes ácidos deve-se que estes em sua forma não dissociadas, os quais são lipossolúveis, podem difundir-se através da membrana citoplasmática. (LOHMEIER-VOGEL; SOPHER; LEE, 1998; MILLS; SANDOVAL; GILL, 2009). Ao penetrar no citoplasma e difundir-se com valores mais elevados de pH, ocorre a dissociação destes ácidos, reduzindo assim o pH intracelular, acumulando ânions e desta maneira alterando a produção de ATP pela ATPase da membrana citoplasmática. LOHMEIER-VOGEL; SOPHER; LEE, 1998; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000b).

Já os compostos fenólicos derivados de lignina causam principalmente ruptura em membranas biológicas e provocam a perda de integridade, o que afeta a sua capacidade de servir como barreira seletiva e matrizes de enzimas (PARAWIRA; TEKERE, 2011).

Existem diferentes métodos para a remoção dos compostos inibitórios presentes no hidrolisado hemicelulósico. A tabela 5 apresenta características destes principais métodos, enquanto os processos de *overliming* e carvão ativo, utilizados neste trabalho, são apresentados em maiores detalhes no item 2.5.2.1.

Tabela 5 - Diferentes métodos de destoxificação de hidrolisado hemicelulósico

Método	Características
Evaporação	A concentração por evaporação a vácuo é um método simples de destoxificação física, uma vez que o hidrolisado submetido a alta temperatura apresenta redução de concentração de compostos voláteis, como ácido acético, furfural e vanilina (ANISH; RAO, 2010). No entanto, este método tem a desvantagem de aumentar a concentração de substâncias não voláteis tóxicas, como extrativos (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).
Extração por membranas	Neste processo as membranas empregadas no pré-tratamento possuem grupos funcionais de superfície ligados aos seus poros internos, que podem eliminar inibidores metabólicos (CHANDEL; SILVA; SINGH, 2011). A extração por membrana é utilizada para remoção de ácido acético e outros compostos como o HMF, furfural, ácido fórmico, levulínico e ácido sulfúrico. A desvantagem desse processo são os altos custos das membranas (WICKRAMASINGHE; GRZENIA, 2008).
Resinas de troca iônica	O método de resinas de troca iônica tem sido relatado como um dos mais eficientes processos de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos (WANG; FENG, 2010). Este processo é conhecido por remover derivados da lignina e inibidores como ácido acético e furfural, e proporcionar um hidrolisado com características que melhoram significativamente o fator de rendimento da fermentação (CHANDEL; SILVA; SINGH, 2011). A principal vantagem é a de que as resinas podem ser regeneradas e reutilizadas, sem afetar a eficiência do tratamento. No entanto, este método apresenta algumas limitações, como a dificuldade de aumento de escala e a queda de pressão do leito em decorrer do tempo de processamento, devido à lenta difusão para acessibilidade ao poro e a possível degradação de produtos frágeis e moléculas biológicas (NILVEBRANT et al., 2001).

Continua

Continuação	
Método	Características
Neutralização	Considerando o baixo pH do hidrolisado hemicelulósico, é necessário a neutralização do pH a valores próximo àqueles das condições de fermentação. Na etapa de neutralização, compostos fenólicos e furfural são removidos devido a precipitações em diferentes pH (CHANDEL; SILVA; SINGH, 2011). Os compostos hidróxido de cálcio e hidróxido de sódio são os agentes químicos normalmente utilizados na neutralização dos hidrolisados. A adição de Ca(OH)_2 gera CaSO_4 precipitado, no entanto, se faz necessário que seja removido sob centrifugação ou filtração, incluindo mais uma etapa no processo. Autores relatam que apenas o processo de neutralização individualmente não é um método eficaz para remover os compostos tóxicos, sendo necessária a sua utilização associada a outro método, como por exemplo, a utilização de carvão vegetal (ANTUNES et al., 2014).
Extração por solventes	Este método consiste em extrair compostos por meio do uso de solventes. Este processo é considerado um método eficiente de destoxificação devido à grande remoção de inibidores tais como o ácido acético, furfural, vanilina, ácido 4-hidroxibenzoico, compostos fenólicos e de baixo peso molecular (CANILHA et al., 2012). Os solventes mais comuns encontrados no presente processo são o acetato de etila, clorofórmio e tricloroetileno, ambos operando de maneira semelhante (CANTARELLA et al., 2004).
Destoxificação Biológica	Métodos de destoxificação biológica usam enzimas específicas ou microrganismos que atuam e modificam a composição de compostos inibidores presente em hidrolisados hemicelulósicos (ANISH; RAO, 2010). Comparado aos métodos químicos e físicos, a destoxificação biológica apresenta vantagens por poder ser realizada diretamente no reator de fermentação antes da adição dos microrganismos fermentativos e em condições moderadas de pH, além de apresentar menores custos energéticos e não gerar sub-produtos (HOU-RUI et al., 2009; CHANDEL; SILVA; SINGH, 2011). Entre as enzimas utilizadas, destacam-se as lacases e

Continua

Conclusão	
Método	Características
Destoxificação	peroxidases, sendo que seu mecanismo envolve polimerização oxidativa de compostos de baixo peso molecular, que catalisam a oxidação de fenóis
Biológica	substituídos, anilinas e tióis aromáticos, em detrimento do oxigênio molecular (MORENO et al., 2012; MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Fonte: Arquivo Pessoal

2.5.2.1 Detoxificação por *overliming* e carvão ativo

Entre os diferentes métodos de destoxificação, o *overliming* é reportado como um dos métodos mais utilizados, em função de sua simplicidade e eficiência (ZHU et al., 2009). Este processo consiste na elevação do pH do hidrolisado ácido e em seguida em sua redução até o valor desejável a fermentação. O princípio deste processo é a precipitação dos componentes tóxicos devido à instabilidade de alguns compostos a alterações de pH (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000b).

Um dos primeiros estudos envolvendo o método *overliming* foi relatado por Sjolander, Langlykke e Peterson (1938). Com o intuito de destoxificar o hidrolisado de madeira para produção de álcool butílico, os autores elevaram o pH até 10 usando carbonato de cálcio, a fim de precipitar ferro e cobre. Ainda que este método seja antigo, este processo de destoxificação ainda é um dos mais empregados e promissores, mostrando ser eficiente para remoção de furanos, ainda sendo efetivamente econômico (ANTUNES et al., 2014).

De acordo com Martinez et al. (2000), o processo de elevação de pH do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para 10 com Ca(OH)_2 , reduziu as concentrações de hidroximetilfurfural, furfural e compostos fenólicos em aproximadamente 20%. No entanto, este processo não reduziu concentrações de ácidos orgânicos como o ácido acético, fórmico, e levulínico. No processo de *overliming*, utiliza-se normalmente os compostos Ca(OH)_2 ou NaOH , e H_2SO_4 ou H_3PO_4 , para as etapas de alcalinização e acidificação, respectivamente (ALVES et al., 1998; CANILHA et al., 2012). Por exemplo, Mussato e Roberto (2001) relataram que a elevação de pH de

hidrolisado ácido de palha de arroz com NaOH para 8, com seguida redução utilizando H_2SO_4 até 6,5 promoveu 18% de remoção de compostos fenólicos.

No entanto, é comum encontrar o tratamento de *overliming* associado a outro método, com o propósito de aumentar a eficiência de destoxificação. Por exemplo, pode-se destacar o trabalho desenvolvido por Zhuang et al. (2009), utilizando o hidrolisado hemicelulósico obtido por tratamento com ácido fórmico. Nesta investigação, foi testado o uso de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ em associação com solventes. Para este estudo, os autores obtiveram 59,76% e 63,51% de remoção de furfural empregando a associação de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e etilacetato e éter, respectivamente. Em outro exemplo, Zhuang et al. (2012) avaliaram diferentes métodos conjuntos ao *overliming* para destoxificação de hidrolisado ácido de palha de trigo obtido após tratamento com ácido fórmico. Este estudo mostrou que o tratamento utilizando *overliming* associado a resinas de iônica foi o método mais eficaz para a remoção do ácido fórmico e de outros inibidores, tais como furfural, ácido acético e fenóis.

A adsorção por carvão ativo é um método de destoxificação considerado de baixo custo e eficiente para a remoção de compostos inibidores. Este método remove principalmente os compostos fenólicos e não oferece grandes mudanças nas concentrações de açúcares fermentescíveis (MUSSATTO; ROBERTO, 2001). Lee et al. (2011) avaliaram o uso de carvão ativo para destoxificação de hidrolisado de madeira para produção de etanol. Os resultados mostraram que o uso de 2,5% em massa de carvão removeu cerca de 42% de ácido fórmico, 14% de ácido acético, 96% de hidroximetilfurfural (HMF) e 93% de furfural, com aumento da produção de etanol. Em outros estudos, Alves et al. (1998) e Meinita, Hong e Jeong (2012) relataram que a destoxificação por carvão ativo aumentou a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico para produção de xilitol e etanol, resultando em aumento de fator de rendimento e produtividade volumétrica dos processos. Encontra-se também trabalhos utilizando carvão ativo associado a outro método. Por exemplo, Alves et al. (1998) desenvolveram uma metodologia de destoxificação para hidrolisado hemicelulósico ácido, que consiste na elevação do valor de pH para 7,0 com CaO , reduzindo-o a 5,5 com H_3PO_4 , seguido do uso de 2,4% de carvão ativo. Para a produção de xilitol, sob estas condições de destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, os autores observaram $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,79 g/g e 0,52 g/l.h, respectivamente.

2.6 MICRORGANISMOS FERMENTADORES DE PENTOSE

Métodos para fermentação de açúcares hexoses já são conhecidos desde a antiguidade pelo homem quando Sumérios, Babilônios e Egípcios começaram a aperfeiçoar e descrever o processo de fabricação de cerveja a partir de grãos (amido) (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAALJ, 2005). Atualmente, para a produção de etanol a partir de açúcares hexoses, destacam-se as bactérias *Clostridium sp* e *Zymomonas mobilis*, e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (FLICKINGER; DREW, 1999). Estes microrganismos convertem a glicose a etanol pela via glicolítica, onde uma molécula de glicose gera 2 moléculas de etanol e 2 moléculas de gás carbônico, com um fator de rendimento ($Y_{P/S}$) teórico de 0,51 gramas de etanol por grama de glicose.

Entretanto, para o etanol de segunda geração, um fator fundamental para o estabelecimento de sua tecnologia a partir de materiais lignocelulósicos é a busca por microrganismos promissores com a capacidade de fermentar açúcares pentoses. Observa-se um aumento crescente de pesquisas envolvendo a fermentação de xilose a partir da década de 1980, quando um número de leveduras do tipo selvagem que tinham essa capacidade foram identificadas (JEFFRIES, 1983).

Neste contexto, na década de 1990, Olsson e Hahn-Hägerdal (1996) apresentaram uma série de microrganismos assimiladores de pentoses, como bactérias (*Bacillus marcerans* DMS 1574, *Bacterioides polypragmatus* NRCC 2288, *Clostridium saccharolyticum* ATCC 35040, *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E) e fungos filamentosos: *Fusarium avenaceum* VTT-D-80146, *F. clamydosporem* VTT-D-77055, *F. culmorum* VTT-D-80148, *F. lycopersici* ATCC 16417, *F. oxysporium* VTT-D-80134, *F. sambucium* VTT-D-77056, *F. solani* VTT-D-77057, *Molina sp*).

Entre os microrganismos fermentadores de pentoses, o desempenho de leveduras na produtividade e rendimento em etanol são maiores em relação à bactérias e fungos (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). As células de leveduras são maiores, apresentam melhor crescimento a baixos valores de pH, menor exigências nutricionais e maior resistência à contaminação, sendo assim mais empregada na fermentação de pentoses em etanol do que outros microrganismos (JEFFRIES, 2006).

Entretanto, ressalta-se que ainda são poucas as leveduras conhecidas que exibem a capacidade de assimilar eficientemente a xilose. Apenas um número reduzido de linhagens

exibe essa capacidade, representando cerca de apenas 1,5% do total de leveduras caracterizadas. Dentre estas, as nativas *Pichia stipitis* (classificação taxonômica alterada para *Scheffersomyces stipitis* (HA et al., 2011; MILESSI et al., 2015) e *Scheffersomyces shehatae* (Sinônimo: *Candida shehatae*) (URBINA; BLACKWELL, 2012) são uma das mais estudadas (CHANDEL et al., 2007; ANTUNES et al., 2012). Outras espécies também são encontradas em diferentes trabalhos como *C. lignosa*, *C. insectosa*, *C. tenuis*, *Pachysolen tannophilus* (WOHLBACH et al., 2011), *Spathaspora passalidarum* (NGUYEN et al., 2006) e *S. arborariae* (CUNHA-PEREIRA et al., 2011). Encontra-se na literatura pesquisas para a busca de leveduras cada vez mais promissoras visando maiores valores de eficiência e produtividade para conversão de açúcares pentoses. Por exemplo, Cadete et al. (2012) desenvolveram um trabalho de busca por leveduras fermentadoras de pentoses a partir da biodiversidade brasileira, onde apresenta novas cepas de espécies como: *Candida lignose*, *Scheffersomyces stipits*, *C. amazonensis sp. nov.*, *S. passalidarum*, *Spathaspora passalidarum* e *S. passalidarum*.

Na maioria das bactérias, a xilose convertida ao composto xilulose via isomerização direta, entretanto, em leveduras e fungos filamentosos esta conversão acontece em etapas baseadas em reações de oxirredução, onde a enzima a xilose redutase (XR) converte a xilose em xilitol, composto normalmente excretado. Em leveduras, sob condições anaeróbias, a primeira reação pode ocorrer na presença dos cofatores NADPH ou NADH, o que resulta na pouca formação de xilitol, seguindo o fluxo metabólico para a conversão à etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994). Após a conversão do xilitol em xilulose, o metabolismo continua com a reação de fosforilação, catalisada pela enzima xiluloquinase que converte a xilulose a xilulose 5-P. A xilulose 5-P é então metabolizada à intermediários da via glicolítica, como o gliceraldeído 3-P e a frutose 6-P pela via das fosfopentoses, conforme apresentado na Figura 13 (A). Ambos compostos são convertidos em piruvato pela via glicolítica, resultando na formação de etanol, por meio de duas reações sequenciais (descarboxilação pela enzima piruvato descarboxilase, que converte o piruvato a acetaldeído e redução a etanol pela enzima álcool desidrogenase) (TOIVARI et al., 2001; JEFFRIES; JIN, 2004; JEFFRIES, 2006). A aeração em processos fermentativos é um fator de fundamental importância, uma vez que este parâmetro pode desviar o metabolismo do microrganismo para a produção de biomassa ou excreção de bioproduto. Observa-se segundo a literatura, que para condições de anaerobiose, o máximo rendimento

em etanol é de 0,51 g/g, onde 3 mols de xilose geram 5 mols de etanol e 5 mols de CO₂, conforme apresentado na Figura 13 (A) (ALEXANDER; YANG; JEFFRIES, 1988). Entretanto, em sistemas aerados, a fonte de carbono disponível no processo é compartilhada entre a formação de biomassa e a formação do produto, sendo influenciada pelo oxigênio disponível no sistema (SILVA, MUSSATO; ROBERTO, 2010). Neste contexto, Kuyper et al. (2004) apresentam um modelo proposto onde em sistemas com disponibilidade de oxigênio, o rendimento máximo de etanol é de 0,46 g/g, por existir uma maior distribuição da fonte de carbono para a produção de biomassa e formação de bioproduto, conforme apresentado na Figura 13 (B).

Uma outra alternativa para se obter etanol a partir de pentoses, é por meio de microrganismos geneticamente modificados, como por exemplo *Escherichia coli*, *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*, o qual são alterados para expressar a xilose redutase e xilitol desidrogenase em conjunto com a xiluloquinase endógeno e xilose isomerase. Entretanto, a relativa instabilidade genética ainda é um fator limitante em sua aplicação (BAJWA et al., 2010; KUYPER et al., 2003; KARHUMAA; HAHN-HÄGERDAL; GORWA-GRAUSLUND, 2005).

Para a conversão da xilose a etanol, além da fonte de carbono, existe a necessidade de nutrientes no meio de fermentação, necessários para o crescimento, manutenção celular e funções metabólicas (ANTUNES et al., 2014). Entre estes nutrientes, destacam-se as fontes de nitrogênio, comumente encontradas em meios fermentativos na forma de extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio para a síntese de aminoácidos, vitaminas, purinas, pirimidinas e ácidos nucleicos.

Figura 13 - Via metabólica para conversão de xilose a etanol (A) Modelo proposto por Alexander, Yang e Jeffries (1988); (B) Modelo proposto por Kuyper et al. (2004).

Fonte: (A) Adaptado de Alexander, Yang e Jeffries (1988); (B) Adaptado de Kuyper et al. (2004).

2.6.1 A levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2

Na busca por novas leveduras promissoras na fermentação de xilose a etanol, o Laboratório de Ecologia e Biotecnologia do ICB/UFMG tem apresentado importantes contribuições, com o isolamento de microrganismos com este potencial a partir do ecossistema brasileiro. Neste sentido, entre leveduras nativas selecionadas, destaca-se a *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2, onde em ensaios preliminares, observou-se seu potencial em vista de sua propriedade natural de converter açúcares pentoses à etanol.

A levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2, utilizada neste trabalho, foi isolada a partir de uma amostra de madeira em decomposição cultivada em meio à base de xilana (xilana 1 %, Yeast Nitrogen Base 0,67 %, cloranfenicol 0,02 %, pH 5,0 ± 0,2) coletada na Reserva do Patrimônio Particular Natural Bello & Kerida, localizada em Rio Grande de Cima, no município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro. Essa reserva apresenta uma área total de 13,7 hectares compreendendo o bioma Mata Atlântica, com a transição de floresta umbrófila densa e semidecídua. O clima da região é caracterizado por ser

tropical de altitude, com invernos frios e secos e verões amenos e úmidos, sendo a temperatura média em torno de 16 °C.

2.7. CONDUÇÃO DE BIOPROCESSOS UTILIZANDO CÉLULAS IMOBILIZADAS

O processo de imobilização celular consiste no confinamento físico de células em uma região definida de espaço, de modo a manter suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua, possibilitando sua reutilização e proteção (COVIZZI et al., 2007).

A imobilização celular é uma técnica aplicada em muitas áreas, como biomedicina, farmacologia, cosmetologia, alimentos e ciências agrícolas, produção de bebidas, tratamento de resíduos industriais e aplicações analíticas (DOAA; WAFSA, 2009). Pode-se também citar como exemplo o uso de células imobilizadas na produção de vinagre, ácido propiônico, ácido cítrico, bem como na indústria de laticínios e em processamento de frutas e vegetais (STASIAK-RÓŻAŃSKA; BŁAŻEJAK; MIKLASZEWSKA, 2011).

Neste contexto, desde a década de 70, observa-se um aumento crescente no número de pesquisas envolvendo imobilização de células e enzimas (COVIZZI et al., 2007; AKIN, 1987). As principais vantagens associadas ao uso de sistemas com células imobilizadas são: maior resistência mecânica para a retenção de células ativas em reatores; maior produtividade volumétrica, como resultado de uma maior densidade de células; tolerância a maiores concentrações de substrato, produtos e compostos inibitórios; relativa facilidade de processamento e separação; elevada eficiência em diferentes tipos de biorreatores, biocompatibilidade, alta porosidade, entre outras (IVANOVA; PETROVA; HRISTOV, 2011).

Entretanto, entre todas estas vantagens, ressalta-se a facilidade de separação e reuso do biocatalisador, de forma a poder ser usado em processos de bateladas repetidas. Neste processo, ao final de cada batelada as células imobilizadas podem ser facilmente separadas e utilizadas em uma nova batelada, aumentando assim a eficiência e produtividade do processo ao eliminar dispendiosos tempos e custos para a separação de células livres ou preparo de um novo inóculo (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2007). Segundo García-Martínez et al. (2012), outra vantagem em se utilizar células imobilizadas

é que as mesmas estariam menos expostas aos efeitos inibitórios de elevadas concentrações de substrato e de produto.

Para o uso em um bioprocesso, de acordo com Akin (1987), os sistemas imobilizados devem atender aos seguintes critérios:

- Não reduzir a atividade biocatalítica das células;
- Não reagir com substratos, nutrientes ou produtos;
- Manter-se fisicamente estável durante todo o processo e ser insolúvel ao meio utilizado;
- Permitir permeabilidade aos reagentes e produtos;
- Ter alta área superficial;
- Ter alto coeficiente de difusão para substratos, nutrientes e produtos;
- Ser resistente a degradação microbiana;
- Manter estabilidade química e térmica em condições de armazenamento celular;
- Possibilitar aumento de escala;
- Ser elasticamente suficiente para o crescimento celular interno;
- Ser reconhecido como seguro e apropriado para uso alimentício e farmacêutico;
- Ter boa disponibilidade de venda e qualidade para ser comercializado em grandes quantidades e com preço competitivo;
- Ser seguro e simples para uso e armazenamento, além de requerer poucas etapas e ingredientes para o seu preparo.

Quanto às desvantagens do uso de células imobilizadas, ressaltam-se problemas com transferência de massa, oxigênio e acesso dos nutrientes entre meio de fermentação e células. Não existe um suporte padrão ou que ofereça maiores vantagens, sendo necessários estudos para o melhor método e tipo de suporte mais adequado a cada tipo de processo.

Existem diversos métodos e materiais para a imobilização de biocatalisadores. Entre suportes inorgânicos destacam-se os naturais (argilas de bentonite, sílica, pedra-pomes) e materiais preparados (óxidos de metal e de vidro com tamanho de poro controlado, vidro, alumina, cerâmicas, gel de sílica). Quanto aos suportes orgânicos, estes

podem ser classificados como polímeros naturais, que por sua vez se dividem em polissacáridos (por exemplo, celulose, amido, dextranos, agar-agar, agarose, alginato, quitina, quitosano), proteínas fibrosas (por exemplo, colagénio, queratina) e polímeros sintéticos como poliolefinas (poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos) e outros tipos (álcool polivinílico, poliamidas) (AKIN, 1987).

A escolha do tipo de imobilização a ser utilizada em um bioprocessamento deve ser baseada em fatores conjuntos como o tipo de biocatalisador, suporte, método e meio (SANTOS, 2005; ABDELMAJEED; KHELIL; DANIAL, 2012). Estes métodos e técnicas podem ser agrupados de acordo com a técnica empregada, como por exemplo imobilização por adsorção, superfície, retenção mecânica por barreira, auto-agregação de células por floculação e encapsulação em matrizes porosas (KOURKOUTAS et al., 2004; IVANOVA; PETROVA; HRISTOV, 2011). A tabela 6 apresenta características de principais técnicas de imobilização de células e enzimas, enquanto o processo de encapsulação em matrizes porosas, utilizado neste trabalho, é apresentado em maiores detalhes no item 2.7.1.

Tabela 6 - Características dos principais métodos de imobilização de células e enzimas

Método	Característica
Adsorção	A adsorção é o método de imobilização mais simples, o qual normalmente preserva a atividade catalítica do biocatalisador. Este método baseia-se principalmente na adsorção física em que os catalisadores são ligados à matriz por meio de interações químicas, como por exemplo, forças de van der Waals, pontes de hidrogénio, interações hidrofóbicas e ligações iônicas (KLEIN; ZIEHR, 1990; BRENA; BATISTA-VIEIRA, 2006).
Retenção mecânica por barreira	Este método de imobilização envolve a utilização de barreiras pré-formadas (filtros de membrana microporosa, e microcápsulas) ou a formação “ <i>in situ</i> ” da barreira em torno das células a serem imobilizadas (KOURKOUTAS et al., 2004).

Continua

Conclusão

Método	Característica
Superfície	Este método envolve a adesão das células ao suporte de imobilização por meio de adsorção natural ou métodos químicos com formação de ligações cruzadas utilizando reagentes bifuncionais que provocam ligações intermoleculares entre as moléculas do catalisador. Entre estes reagentes bifuncionais, destaca-se glutaraldeídos, dialdeídos diiminoésteres, diisocianatos, sais bisdiazonio e diaminas (MEHTA et al., 1997). O resultados das ligações cruzadas são biocatalisadores com ligações intermoleculares irreversíveis que podem resistir a condições extremas de pH e temperatura (MATEO; ABIAN; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2000).
Auto-agregação do células por floculação	Este método consiste em agregar ou flocular as células de maneira natural ou artificialmente induzida. Os tamanhos maiores destes agregados celulares permitem a utilização em grandes biorreatores (KOURKOUTAS et al., 2004).

Fonte: Arquivo pessoal

2.7.1 Encapsulação em matrizes porosa

O método de imobilização por aprisionamento em matrizes porosas envolve a difusão das células em uma matriz pré-formada ou a síntese “*in situ*” da matriz porosa em torno das células e é uma das técnicas mais utilizadas devido a sua eficiência e facilidade de operação (KOURKOUTAS et al., 2004). Este método permite a encapsulação simultânea de uma grande variedade de enzimas e células, permitindo a realização de reações que ocorrem em várias etapas (PARK; CHANG, 2000). No encapsulamento os biocatalisadores são envolvidos por uma membrana semipermeável, o qual permite a passagem de moléculas de substrato e de produto, porém com a manutenção de células em seu interior. Estas membranas semipermeáveis podem ser geradas por polimerização ou por tensoativos. As microcápsulas obtidas são esféricas e suas dimensões variam entre 1 a 100 mm de diâmetro. Neste método, entre os materiais mais empregados para

encapsulamento destacam-se o alginato de cálcio, a k-carragenina, o álcool polivinílico, o ágar, a gelatina, a quitosana e a poliacrilamida.

A Figura 14 apresenta os principais métodos de imobilização celular.

Figura 14 - Esquema representativo de diferentes métodos de imobilização

Fonte: Adaptado de Covizzi et al. (2007).

Entre as principais técnicas utilizadas para o processo de imobilização celular por encapsulamento em matrizes porosas, destaca-se o método de aprisionamento em gel de alginato de cálcio, devido a sua simplicidade, alta empregabilidade e resultados significativos de eficiência em conversão a produtos em bioprocessos (NIGAM, 2000b).

2.7.1.1 Imobilização de células pelo método do aprisionamento em gel de alginato de cálcio

Sistemas com biocatalisadores imobilizados são sujeitos a limitações no fornecimento de nutrientes para o interior das células. Assim, devido à presença de materiais heterogêneos tais como as células imobilizadas, não há fluxo convectivo dentro das esferas e as células podem receber nutrientes apenas por difusão (RILEY et al., 1996).

Entretanto a imobilização de células a uma matriz sólida é um meio alternativo de retenção em uma matriz, porém sem perdas significativas de transferência de massa (SENTHURAN et al., 1997).

O processo de imobilização em gel é realizado por uma suspensão do biocatalisador em uma solução de monômeros e o processo de polimerização é iniciado por uma mudança na temperatura ou por adição de um reagente químico. Este processo pode ser utilizado com a retenção do biocatalisador no interior de um gel ou em microcavidades de uma fibra sintética (MEENA; RAJA, 2006). Neste método, quando utilizado o gel, encontram-se materiais naturais de imobilização como ágar, agarose, alginato, colágenos e gelatinas, polímeros naturais quimicamente modificados como celulose, acetato, e géis sintéticos como poliacrilamida, poliazetidina e polihidróximetilacrilato (AKIN, 1987).

Entre as diferentes técnicas de imobilização, o gel de alginato de cálcio têm sido relatado como um dos mais utilizados para aprisionamento de células, devido à sua simplicidade e caráter não tóxico de sua estrutura. O alginato é amplamente utilizado na indústria alimentar, farmacêutica, têxtil, e produtos de papel, podendo ser utilizado na forma de espessante, gel estabilizante e de formação de película. O alginato de sódio é um polissacarídeo linear, normalmente isolado de cepas de algas marinhas. Este copolímero é composto por moléculas de ácido D-manurônico (M) e ácido L-glucurônico (G) (KAWAGUTI; SATO, 2008) (Figura 15 (A)) .

A técnica de imobilização por alginato de cálcio envolve a adição de uma suspensão de células em solução de alginato de sódio e gotejamento desta em solução de cloreto de cálcio, com a formação de gel de alginato de cálcio precipitado em forma de grânulos com células em seu interior (GÖKSUNGUR; ZORLU, 2001). A permutação de íons de sódio com íons de cálcio em solução gera a solidificação do alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio (Figura 15 (B)). Esse fato ocorre pois os íons cálcio formam ligações cruzadas com o alginato, aumentando sua viscosidade até a formação do gel (SANTOS, 2005). Dependendo do tipo de sal o qual serão associados, as combinações destes ácidos podem ser solúveis ou não em água. O sal de sódio é solúvel em água, enquanto que os sais de cátions polivalentes, como o de cálcio, não são solúveis em água, com exceção aos de magnésio (NAJAFPOUR; YOUNESI; ISMAIL, 2004).

Figura 15 - (A) (1) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos; (2) cadeia de resíduos de ácidos gulurônicos; (3) cadeia de resíduos de ácidos manurônicos e ácidos gulurônicos alternados (B) Permutação de íons de sódio com íons de cálcio em solução gerando a solidificação do alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio

Fonte: Adaptado de Kawaguti e Sato (2008).

Segundo Peart et al. (2012), o alginato de cálcio é frequentemente utilizado para imobilizar células de leveduras em processos de fermentação a etanol. Por exemplo, Behera et al. (2010) relataram aumento de eficiência de processo de produção de etanol utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio, quando comparado a outros métodos de imobilização. Phisalaphong et al. (2007) observaram que o alginato apresenta grande estabilidade a longo prazo de utilização e, que após um período de armazenamento de 4 meses, células de levedura imobilizada ainda mantinham-se ativas. Células imobilizadas apresentam elevado uso quando associados a reatores, devido a eficiência desta técnica associado as vantagens do uso de biorreatores (SANTOS, 2005).

2.8 PRINCIPAIS BIORREATORES APLICADOS A CÉLULAS IMOBILIZADAS

A escolha de um reator para um processo biotecnológico, bem como seu modo de operação, depende de vários fatores, como por exemplo: praticidade de operação, propriedades de mistura e homogeneização, transferência de massa e oxigênio, contato do fluido com o catalisador, facilidade de aumento de escala, cinética da reação e controle do processo e custos (KARKARE, 1991).

Os biorreatores utilizados para o uso com sistemas imobilizados são geralmente classificados em: reatores de mistura, com partículas suspensas (STR – *Stirred Tank Reactor*), Coluna de Bolhas e Leito fluidizado (FBR - *Fluidized Bed Reactor*), partículas ou grandes superfícies fixas : leito fixo, leito percolado, cultivo em superfície, membranas superfícies móveis superfícies rotativas (discos cilíndricos)(SANTOS, 2005).

Diferentes tipos de processos são reportados com o uso de diversos tipos de reatores operados com células imobilizadas. Ressalta-se que cada método em conjunto a diferentes biorreatores apresentam suas características próprias ao processo, de modo que são necessários estudos e investigações para a devida escolha da melhor combinação do binômio método de imobilização-biorreator. Neste contexto, o uso do reator de leito fluidizado associado ao uso de células imobilizadas em matriz de alginato de cálcio mostra-se como um promissor método para a obtenção de bioprodutos (SARROUH, 2009; SANTOS, 2005).

2.8.1 Biorreator De Leito Fluidizado

A fluidização é um processo em que partículas sólidas são suspensas em um determinado fluido em um sistema, de modo que um fluxo desse fluido (gás ou líquido) ascendente através de um leito de partículas em velocidade suficiente possa suportar as mesmas. Em reatores de leito fluidizado, este fenômeno de arraste ocorre devido a força do fluxo do líquido imerso exercida nas partículas, e/ou por uma corrente de gás, sendo o mais comum o ar (BLOMGREM et al., 2007; AL-RUBEAI; ALIWI, 2010).

Os reatores de leito fluidizado normalmente são tubulares ou cônicos, contendo em sua parte inferior uma placa de fundo poroso, a qual o meio de fluidização, gasoso ou líquido, pode ser introduzido (Figura 16).

Operando-se o reator em baixas vazões de fluxo, o fluido injetado infiltra-se entre os espaços vazios entre os sólidos, onde as forças atuantes sendo menores que o peso do leito, mantém um sistema empacotado, denominado de leito fixo. Entretanto, a medida em que se aumenta a vazão de fluxo, as forças atuantes devido a interação entre fluido/partícula, sendo maiores que o peso do leito, promovem a suspensão das partículas sólidas, de modo que o sistema possa entrar em estado de fluidização (BLOMGREM et al., 2007).

Figura 16 - Esquema de um Reator de leito fluidizado (A) Fundo cilíndrico (B) Fundo cônico

Fonte: Adaptado de BARON; WILLAERT; BACKER, (1996).

A transição entre os estados fixo e fluidizado é bastante gradual e complexa de definir. Em um certo fluxo de operação, por exemplo, a força de arraste sobre as partículas pode não ser suficiente para neutralizar a força da gravidade sobre as mesmas. Entretanto, após um certo nível de elevação de velocidade do fluido utilizado, a resistência para o estado estacionário torna-se menor e as partículas iniciam o processo de arraste. Esta velocidade é denominada como velocidade mínima de fluidização (U_f) e é um parâmetro fundamental utilizado, sendo considerado um dos mais importantes na classificação para caracterização do comportamento destes reatores. A velocidade de fluidização é sensível à forma, densidade e tamanho das partículas sólidas, bem como de características do fluido. Estes parâmetros são de difícil medição com precisão, de maneira que na prática utiliza-se modelos empíricos e experimentais para a determinação do mesmo (AL RUBEAI; ALIWI, 2010).

Uma compreensão das características hidrodinâmicas para reatores de leito fluidizado representa um desafio devido à complexa dinâmica e difícil previsibilidade do comportamento do leito. No entanto, para a descrição de algumas características

hidrodinâmicas, alguns parâmetros podem ser quantificados e calculados, como pressão, porosidade do leito, coeficiente de transferência de calor instantâneo, entre outros (GUO et al., 2003). Entretanto, existem alguns parâmetros que são aplicáveis a estes sistemas, baseados em geometrias e características fluído/partícula, o qual podem ser medidos e analisados. Entre eles, está o cálculo da velocidade terminal das partículas no reator (U_t) (WU et al., 2003).

Para entender o comportamento hidrodinâmico de um reator de leito fluidizado, existem muitas regras de dimensionamento que são derivadas de balanço de massa e momento, resultante em uma hidrodinâmica adimensional, onde se deve ser levados em conta principalmente números adimensionais como Número de Reynolds (Re), Número de Froude (Fr), relação densidade da partícula/densidade do fluido, entre outros (GLICKSMAN, 1984). Para um dimensionamento adequado, estes números devem ser mantidos constantes, em conjunto com relações geométricas do reator, além da mecânica adicional, como por exemplo, o coeficiente de restituição (CR), (razão de velocidades antes e após impacto) característica para sistemas de fluidos e partículas sólidas (SCHOUTEN; VANDER STAPPEN; VAN DEN BLEEK, 1996).

Uma das principais particularidades do reator de leito fluidizado é sua excelente capacidade de transferência de calor e homogeneidade do meio reacional e catalisador, devido a sua configuração geométrica, além de poder-se operar em sistema com pressões relativamente baixas. Estas características fazem com que este reator possa ser empregado por diferentes processos, desta forma sendo muito utilizado em indústrias químicas (BLEEK; SCHOUTEN, 1993; AL-RUBEAI; ALIWI, 2010).

Quando comparado o modo de operação do reator de leito fluidizado com o de leito fixo, o FBR apresenta vantagens como maior controle contra aglomerações e caminhos preferenciais do leito, temperatura uniforme e maior eficiência devido ao aumento da superfície de contato do catalisador com a fase líquida (WU et al., 2003). Entretanto, uma desvantagem desse tipo de reator é uma maior complexidade para adequar taxas de alimentação e fluidização, além de ser necessário operar com partículas sólidas densas e com fluidos de baixa viscosidade (SANTOS, 2005).

Uma outra classe de reatores muito empregada em bioprocessos são os de tanque agitado (*STR – Stirred reactor tank*), característicos por garantir homogeneidade do meio reacional e operação com diferentes intensidades de agitação, geradas por agitadores

mecânicos. Entretanto, este tipo de reator se operado em alta agitação, pode ocasionar ruptura de determinadas matrizes sensíveis, além de apresentarem altos custos energéticos para seu devido funcionamento (BARON; WILLAERT; BACKER, 1996). O *FBR*, quando comparado com o *STR*, apresenta melhores taxas de transferência de massa, podendo ser operados em sistemas bifásicos (sólido/líquido) ou trifásicos (sólido/gás/líquido) e sem problemas com indesejadas tensões de cisalhamento, uma vez que o mesmo não utiliza agitadores mecânicos. Considerando esta característica, processos que necessitem alto suprimento de oxigênio podem ser empregados, apresentando assim grande potencial para o uso com células ou enzimas imobilizadas (BARON; WILLAERT; BACKER, 1996).

O uso de biocatalisadores imobilizados em processos industriais tem sido realizado em diferentes configurações de reatores, principalmente em reatores de leito fluidizado. Encontra-se na literatura pertinente processos biotecnológicos que utilizam estes reatores na obtenção de diferentes produtos como, por exemplo, a produção de ácido acético, (SUN; FURUSAKI, 1990), síntese de hidrogênio (LIN; WU; CHANG, 2006), ácidos orgânicos (SHIDA et al., 2009), entre outros.

3. OBJETIVOS

Avaliar a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, por via fermentativa utilizando células imobilizadas de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 em processo operado em biorreator de leito fluidizado.

- Avaliar e definir um meio nutricional de suplementação para a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, visando a produção de etanol, empregando a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.
- Definir, por meio de metodologia de planejamento de experimentos, condições de imobilização de células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 para a produção de etanol, avaliando a influência dos parâmetros concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio e tempo de cura.
- Avaliar a estabilidade do sistema de produção de etanol em frascos Erlenmeyer utilizando células imobilizadas, por meio de bateladas repetidas, utilizando condições pré-determinadas.
- Definir, por meio de metodologia de planejamento de experimentos, condições de processo de produção de etanol utilizando células imobilizadas, em reator de leito fluidizado, avaliando a influência dos parâmetros vazão de aeração e massa de suporte com células imobilizadas.
- Avaliar a estabilidade do sistema de produção de etanol em reator de leito fluidizado utilizando células imobilizadas, por meio de bateladas repetidas, utilizando condições pré-determinadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA E PREPARO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

Foi utilizado o bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina São Francisco localizada em Sertãozinho/SP. O hidrolisado hemicelulósico foi obtido em reator de hidrólise de 200 l em condições previamente determinadas por Alves et al. (1998), onde o bagaço foi percolado com H_2SO_4 (98% de pureza) como catalisador em uma razão de 100 mg H_2SO_4 /g de matéria seca à temperatura de 121° C durante 20 min, em proporção de 1/10 (m/v) entre massa de biomassa e volume da solução ácida. Após resfriado, o hidrolisado obtido foi estocado em câmara fria a 4 °C. O hidrolisado foi então concentrado (fator de concentração igual a 3) sob pressão reduzida em um concentrador com capacidade volumétrica de 32 litros a 70 ° C, a fim de aumentar a concentração de xilose para cerca de 30 g/l. Após esta etapa, o hidrolisado foi caracterizado quimicamente pela determinação de seus açúcares componentes, e tratado conforme metodologia estabelecida por Alves et al. (1998), a qual envolveu três fases:

1^aFase: Elevação do pH até 7,0 com óxido de cálcio; 2^aFase: Redução do pH até 5,5 com ácido fosfórico; 3^aFase: Adição de carvão ativo na proporção 2,5% m/v, sendo a mistura mantida em incubadora de movimento rotatório à 30°C e 200 rpm, por 1 hora.

Após cada uma das fases desse tratamento, o hidrolisado foi filtrado sob vácuo. Em uma última etapa, o hidrolisado foi autoclavado sob pressão manométrica à 0,5 atm por 20 min.

4.1.1 Cálculo do fator de severidade ($\log(Ro)$)

O cálculo do fator de severidade do processo ($\log(Ro)$) (SCORDIA et al., 2010) de pré-tratamento foi calculado, segundo relação apresentada por Overend e Chornet (1987), conforme *Equação 2*.

$$Ro = t \cdot e^{l(T - T_{ref}) / (14,75)} \quad (2)$$

Onde:

t: é o tempo de residência do material no reator (min)

T: temperatura em °C

T_{ref}: temperatura de referência, usualmente ajustada para 100 °C.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E CELULIGNINA

O bagaço de cana-de-açúcar e a celulignina obtida após o pré-tratamento ácido foram caracterizadas quanto a seus componentes químicos (celulose, hemicelulose, lignina e cinzas), segundo a metodologia descrita por Gouveia et al. (2009). Para estas determinações, foram realizadas triplicatas contendo 2 g (massa seca) de cada amostra. Em béqueres de vidro, as amostras foram tratadas com H₂SO₄ a 72% (v/v), mantidos em banho termostatzado a 45 °C por 7 minutos, permanecendo em continua agitação durante todo o processo.

A reação foi então interrompida com 275 ml de água destilada, e o material foi transferido quantitativamente para frascos Erlenmeyer de 500 ml, sendo devidamente identificados, fechados com papel alumínio e autoclavados a 121 °C por 30 minutos. Após este tempo, o material foi retirado e resfriado até atingir a temperatura ambiente e então filtrado quantitativamente em funis contendo papel de filtro qualitativo Whatman R n° 1, previamente tarados. O hidrolisado resultante foi coletado em balão volumétrico de 500 ml, sendo o volume deste ajustado com água destilada, homogeneizado e armazenado para determinação das concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF). Para determinação da celulose e hemicelulose presente nas amostras, utilizaram-se, respectivamente, as *Equações 3 e 4*.

$$\% C = \% Cel * 0,95 + \% Gli * 0,9 + \% HMF * 1,29 + \% A.F * 3,09 \quad (3)$$

$$\% H = \% Xil * 0,88 + \% Ara * 0,88 + \% Fur * 1,38 + \% A.A * 0,7 \quad (4)$$

Para determinação da lignina solúvel presente no hidrolisado, 5 ml do hidrolisado foram transferidos para balões volumétricos de 100 ml e adicionados de 40 gotas de NaOH 6,5 M. Os volumes dos balões foram devidamente aferidos com água destilada e homogeneizados. A determinação foi feita pela medida de absorbância em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B, a 280 nm e calculada pelas *Equações 5 e 6*:

$$Lignina\ Solúvel\ (g/l) = 0,04187 * (A - A_{dp}) - 0,0003279 \quad (5)$$

$$A_{dp} = (C_F * \varepsilon_F + C_{HMF} * \varepsilon_{HMF}) \quad (6)$$

Onde: A: absorbância da solução a 280 nm; A_{dp} : absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF) a 280 nm; C_f e C_{HMF} : concentração de furfural e HMF, determinadas por CLAE; ε_F e ε_{HMF} : absorvidades do furfural e do HMF que valem respectivamente 146,85 e 114 L/g.cm.

O material sólido retido no papel filtro qualitativo foi lavado exaustivamente com aproximadamente 1,5 L de água destilada, seco ao ar e, em seguida, transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 105 °C. Os filtros contendo o material retido foram transferidos para cadinhos previamente tarados, tampados e acondicionados em mufla de aquecimento elétrico, onde permaneceram a 800 °C por 2 horas. Após o resfriamento, os cadinhos contendo o material foram transferidos para dessecadores e quantificados gravimetricamente quanto ao teor de cinzas, e determinados de acordo com a *Equação 7*:

$$\% Cinzas = (M_C / M_A) * 100 \quad (7)$$

Onde: M_C : Massa de cinzas, M_A : Massa de amostra, seca.

A lignina insolúvel presente nas amostras foi determinada a partir da diferença entre as massas do resíduo seco e a massa de cinzas contida nos cadinhos, conforme a *Equação 8*.

$$\% L_{ki} = ((M_k - M_C) / M_A) * 100 \quad (8)$$

Onde: % L_{ki} : Lignina Klason insolúvel; M_k : Massa seca de lignina insolúvel; M_C : Massa de cinzas; M_A : Massa da amostra base, seca.

4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar

A análise de microscopia eletrônica de varredura do bagaço *in natura* e pré-tratado quimicamente foi realizada como descrito por Chandel et al. (2014). As amostras foram lavadas duas vezes com água bidestilada estéril e distribuída em uma lamela de vidro de 60 milímetros revestida com poli-L-lisina (Sigma Diagnostics, São Paulo, Brasil). Para melhorar a arquitetura de superfície, seções pós-fixadas foram enxaguadas cuidadosamente com 0,1 M de tampão cacodilato e tratada com tiocarbohidrazida 6%. As amostras foram então lavadas com água bidestilada e desidratadas por meio de uma série graduada de soluções de etanol. A seção a seco foi montada em bases de alumínio, por pulverização catódica revestida (JEOL JFC-1600) com uma camada de ouro e usada para digitalização. As amostras preparadas foram digitalizados e fotografadas em um microscópio eletrônico de varredura Hitachi S520 (Hitachi, Tokyo, Japão).

4.3 MICRORGANISMO E OBTENÇÃO DAS CÉLULAS

Em todos os experimentos foi utilizada a linhagem de levedura *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2, proveniente da coleção de culturas da Universidade Federal de Minas Gerais, cedidas pelo Prof. Dr. Carlos A. Rosa, mantida em meio ágar extrato de malte à 4°C. Para obtenção da biomassa utilizada neste trabalho, uma alçada de células provenientes da cultura estoque foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio sintético composto por 30,0 g/l de xilose, 10 g/l de extrato de levedura e 20 g/l de peptona. As células foram cultivadas em incubadora com movimento

rotatório à 30 °C e 200 rpm por 24 horas e recuperadas por centrifugação a 2000 x g por 20 min, lavadas e ressuspensas em água destilada estéril.

4.4 DEFINIÇÃO DE MEIO NUTRICIONAL PARA SELEÇÃO DE NUTRIENTES PARA SUPLEMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

Foram testados diferentes meios nutricionais para os ensaios fermentativos utilizando a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2. A escolha dos meios para estudo foram baseadas na simplicidade, custo e eficiência, sendo testados condições de acordo com os trabalhos de Parekh, Yu, e Wayman (1986), Ge et al. (2011) e Sun e Tao (2010). Estas condições são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Diferentes composições de meios nutricionais para suplementação do hidrolisado hemicelulósico, visando a produção de etanol por células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.

Meio	Meio Nutricional	Autores
1	5g/l de sulfato de amônio 3g/l de extrato de levedura 3g/l de extrato de malte	PAREKH, YU; WAYMAN, (1986).
2	5g/l de peptona 3g/l de extrato de levedura 3g/l de extrato de malte	PAREKH, YU e WAYMAN, (1986)
3	1,73 g/l de sulfato de amônio 3,56 g/l de KH ₂ PO ₄ 2,62 g/l de extrato de levedura	GE et al., (2011).
4	3 g/l de extrato de levedura 0,25 g/l de Uréia 0,25 g/l de cloreto de cálcio 0,25 g/l de sulfato de Magnésio 2,5 g/l de KH ₂ PO ₄	SUN; TAO, (2010).

Fonte: Adaptado de Antunes et al. (2014).

Conduziu-se as fermentações, em duplicatas, em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-açúcar destoxificado suplementado de acordo com os nutrientes descritos na tabela 7. A cada frasco foi adicionado 0,5 g/l de suspensão celular de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, conduzindo os ensaios em incubadora de movimento rotatório (Innova 4000, Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA) à 30°C e 200 rpm, por 48 h. Amostras foram coletadas periodicamente para a determinação das concentrações de açúcares, etanol e produção de biomassa.

4.5 DEFINIÇÃO DE CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR

As células foram imobilizadas pelo método do aprisionamento em gel de alginato de cálcio. Esferas de gel foram produzidas pelo gotejamento de solução de alginato de sódio e suspensão celular em solução de cloreto de cálcio (concentrações conforme item 4.5.1) mantida sobre agitação, conforme apresentado no esquema da Figura 17.

Figura 17 - Esquema de imobilização de células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 em matriz de alginato de cálcio.

Fonte: Arquivo pessoal

As esferas formadas, contendo as células imobilizadas foram mantidas na solução de cloreto de cálcio a 4°C por um determinado período de cura (tempo conforme item 4.5.1). Após este tempo, as esferas foram lavadas em água destilada estéril e utilizadas nos ensaios fermentativos.

4.5.1 Determinação de condições de imobilização celular: Avaliação da influência das variáveis concentração de alginato de sódio, de cloreto de cálcio e tempo de cura nas condições de imobilização celular

Para determinação de condições de imobilização da levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, foram avaliadas como variáveis independentes a concentração de alginato de sódio, concentração da solução de cloreto de cálcio e o tempo de cura.

A suspensão celular obtida conforme o item 4.3, foi adicionada a diferentes soluções de alginato de sódio (*Alginic acid Sodium salt from Brown algae; for immobilization of microorganisms – Fluka analytical*) (previamente autoclavada à 0,5 atm por 20 min), de modo a obter-se uma solução final contendo uma concentração de alginato de sódio de 1%, 1,5% ou 2%, e concentração celular de 3,0 g/l, de acordo com as condições experimentais estudadas em cada ensaio (Tabela 8). Esferas de gel foram produzidas pelo gotejamento desta suspensão em soluções 0,1 M, 0,15 M ou 0,2 M de cloreto de cálcio (previamente autoclavada à 0,5 atm por 20 min) sobre agitação, e posteriormente armazenadas nesta solução a 4°C (sem agitação) por um período de cura de 12, 18 ou 24 h, de acordo com condições do planejamento fatorial (Tabela 8). Após o período de cura, as esferas foram lavadas em água destilada estéril e utilizadas nos ensaios fermentativos. Conduziu-se as fermentações em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 40 ml de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-açúcar destoxificado suplementado (5 g/l de sulfato de amônia, 3 g/l de extrato de levedura e 3 g/l de extrato de malte) e 10 ml de suporte com células imobilizadas. Os ensaios foram conduzidos em incubadora de movimento rotatório (Innova 4000 ,Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA) à 30°C e 200 rpm, por 48 h. Amostras foram coletadas periodicamente para as determinações da concentração de açúcares, etanol e produção de biomassa.

A determinação dos efeitos das variáveis independentes foi realizada por planejamento fatorial completo do tipo 2^3 com três ensaios no ponto central. Foram consideradas como variáveis respostas o fator de rendimento e a produtividade volumétrica

em etanol durante os ensaios fermentativos. Os níveis das variáveis estudadas encontram-se apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Níveis codificados e valores reais do planejamento de experimentos 2^3 para variáveis independentes concentração de alginato de sódio (% m/v), concentração de cloreto de cálcio (M) e tempo de cura (h), no processo imobilização de células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em frascos Erlenmeyer.

Variáveis independentes	(+1)	0	(-1)
(A) Concentração de alginato de sódio (% m/v)	1,0	1,5	2,0
(B) Concentração de cloreto de cálcio (M)	0,1	0,15	0,2
(C) Tempo de cura (h)	12	18	24

Fonte: Arquivo pessoal

A análise das variáveis respostas $Y_{P/S}$ e Q_P foi realizada utilizando-se o programa STATISTICA for Windows (StatSoft, Inc. V.5 Tulsa, OK, USA). Os resultados foram expressos em gráficos de Pareto, tabelas de análise de variância e nível de significativa (p) e gráficos de contorno e superfície de resposta.

4.5.2 Teste com elevada concentração celular interna nas esferas de alginato de cálcio no processo de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizado células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2

Avaliou-se a influência da elevada concentração celular no interior das esferas (definida pela concentração celular em solução de alginato de sódio) no processo de imobilização celular, visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizado células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.

Determinada suspensão celular, obtida conforme o item 4.3, foi adicionada a solução de alginato de sódio (*Alginic acid Sodium salt from Brown algae; for immobilization of microorganisms – Fluka analytical*) (previamente autoclavada à 0,5 atm por 20 min), de modo a obter-se uma solução final contendo uma concentração de alginato de 1%, e concentração celular de 6 g/l. Esferas de gel foram produzidas pelo gotejamento desta suspensão em uma solução 0,2 M de cloreto de cálcio (previamente autoclavada à 0,5 atm por 20 min) mantida sobre agitação, e posteriormente armazenadas nesta solução a 4°C (sem agitação) por um período de cura de 12h. Após o período de cura as esferas

foram lavadas em água destilada estéril e utilizadas nos ensaios fermentativos. Conduziu-se as fermentações, em duplicatas, em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 40 ml de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-açúcar destoxificado suplementado (5 g/l de sulfato de amônio, 3 g/l de extrato de levedura e 3 g/l de extrato de malte) e 10 ml de suporte com células imobilizadas. Os ensaios foram conduzidos em incubadora de movimento rotatório (Innova 4000 ,Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA) à 30°C e 200 rpm, por 48 h,. Amostras foram coletadas periodicamente para a determinação das concentrações de açúcares, etanol e produção de biomassa.

4.5.3 Avaliação do desempenho do sistema de bateladas repetidas em frascos Erlenmeyer

Foram realizadas operações em bateladas consecutivas com reutilização das células imobilizadas.

Conduziu-se as fermentações em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 40 ml de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-açúcar destoxificado suplementado (5 g/l de sulfato de amônio, 3 g/l de extrato de levedura e 3 g/l de extrato de malte) e 10 ml de suporte com células imobilizadas (Condições de imobilização: concentração de alginato de sódio: 1 %, cloreto de cálcio: 0,2 M, tempo de cura: 12 h e concentração celular em solução de alginato de sódio: 3 g/l). Cada batelada, em duplicata, foi conduzida em agitador rotatório (Innova 4000, Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA) à 30°C e 200 rpm, por 72h. Ao final de cada ciclo de batelada, o meio fermentado foi descarregado, as células imobilizadas lavadas e utilizadas como inóculo da batelada seguinte em novo meio de fermentação. Amostras foram coletadas periodicamente para determinação das concentrações de açúcares, etanol e produção de biomassa.

4.6 DEFINIÇÃO DE CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO

O reator de coluna operado em configuração de leito fluidizado utilizado neste trabalho foi adquirido da Bioengineering (Wald, Suíça), marca PID Fermenter AWS, com capacidade de 2,0 litros, conforme apresentado na Figura 18.

Figura 18 - Reator de coluna Bioengineering (2 l)
(Wald, Suíça) marca PID Fermenter AWS.

Fonte: Arquivo pessoal

4.6.1 Cálculo da velocidade mínima de fluidização em reator de leito fluidizado

Para a determinação da velocidade mínima de fluidização, conduziram-se experimentos preenchendo o leito do reator de leito fluidizado com meio reacional (hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado e suplementado) e massas de 100, 150 e 200 g de suporte com células imobilizadas (conforme condições utilizadas em planejamento fatorial realizado neste biorreator, apresentado no item 4.6.3). O fluxo da bomba de recirculação foi gradativamente aumentado até a máxima expansão do leito em área cilíndrica do reator e, em seguida, gradativamente diminuído, sendo registrados os valores de altura de leito correspondentes a cada vazão. Diferentes vazões de recirculação foram medidas por método direto, verificando-se o tempo necessário para que o líquido ocupasse um volume específico em uma proveta. A altura de leito foi medida usando-se uma escala graduada em milímetros.

A velocidade mínima de fluidização (U_{mf}) foi calculada a partir de dados experimentais de porosidade do leito em função da velocidade superficial do líquido, aos quais ajustam-se a correlação de Richardson e Zaki (1954), citados por Zanin (1989) - *Equações 9 e 10*:

$$(U/U_{tc}) = \varepsilon^n \quad (9)$$

$$\ln U = n \cdot \ln \varepsilon + \ln U_{tc} \quad (10)$$

onde:

U... velocidade superficial do fluido

U_{tc}... velocidade terminal corrigida da partícula.

n... coeficiente de expansão

ε... porosidade do leito

A porosidade do leito foi calculada pela *Equação 11*:

$$\varepsilon = (V_t - V_s) / V_t = 1 - M_s / (\rho_s \cdot A \cdot H) \quad (11)$$

onde:

V_t... volume total do reator

V_s... volume do leito de partículas sólidas

M_s... massa de partículas sólidas

ρ_s... densidade seca da partícula

A... área do reator atravessada pelo fluido

H... altura do leito

A área (A) utilizada para o cálculo da porosidade do leito foi correspondente à área da seção transversal (parte cilíndrica) do reator atravessada pelo fluxo ascendente de líquido na região ocupada pelo leito.

A velocidade mínima de fluidização foi considerada como a velocidade superficial do fluido na equação de Richardson e Zaki (1954) para a qual a porosidade do leito correspondeu à altura do leito com velocidade superficial de fluido nula.

4.6.2 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La)

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio foi determinado pela metodologia do “gassing-out”. Utilizando 100, 150 e 200 g de suporte com células

imobilizadas (conforme condições utilizadas em planejamento fatorial realizado neste biorreator, apresentado no item 4.6.3), o oxigênio no meio de cultivo no reator foi removido por borbulhamento de gás nitrogênio até que a concentração de gás dissolvido fosse reduzida a zero. Foi procedida a fluidização do meio apenas com a recirculação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado e suplementado em sua vazão de trabalho (50,8 ml/min), e o aumento na concentração de oxigênio dissolvido foi monitorado em função do tempo por meio de um eletrodo de oxigênio (Mettler Toledo, 341003037/0473401). Por integração da equação de balanço de oxigênio no meio líquido (*Equação 12*), foi possível obter a relação apresentada na *Equação 13*:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (12)$$

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C^*}\right) = -k_L a \times t \quad (13)$$

Onde:

C/C^* corresponde à leitura do eletrodo (fração da concentração de O_2 dissolvido em relação à concentração de saturação).

Calculou-se o valor de $K_L a$ (h^{-1}) em função da linearização do gráfico do logaritmo de $\left(1 - \frac{C}{C^*}\right)$ em função do tempo.

Desconsiderou-se a respiração celular, uma vez que para a determinação de $K_L a$, as células estavam immobilizadas no interior das esferas de alginato de cálcio, bem como o experimento foi realizado em curto espaço de tempo (ordem de segundos).

4.6.3 Avaliação da influência das variáveis vazão de aeração e massa de suporte com células immobilizadas

Para determinação das condições de fermentação de hidrolisado hemicelulósico de

bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado, foram avaliadas as variáveis independentes vazão de ar e massa de suporte com células imobilizadas. Preencheu-se o reator com esferas de aço inoxidável (100g) para redução de tamanho e aumento da área superficial de bolhas de ar. Inseriu-se no reator 100, 150 ou 200 g de suporte e configurou-se o sistema de aeração para vazão de 50, 125 ou 200 ml/min (conforme condições do planejamento de experimentos apresentados na Tabela 9). Recirculou-se 1,8 L de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado e suplementado (5 g/l de sulfato de amônio, 3 g/l de extrato de levedura e 3 g/l de extrato de malte) na vazão de 50,8 ml/s, junto a inserção de 1,5 ml de antiespumante (emulsão de silicone) e 1,193 g do antibiótico Ceftriaxona sódica hemieptaidratada para prevenção de contaminação do meio por bactérias. O processo foi conduzido com recirculação de água a 30°C no encamisamento do reator, por 72h, de modo a conduzir-se a fermentação nesta temperatura. Amostras foram coletadas periodicamente para determinações das concentrações de açúcares, etanol e produção de biomassa.

A determinação dos efeitos das variáveis independentes foi realizada por planejamento fatorial completo do tipo 2^2 com três ensaios no ponto central. Foram consideradas como variáveis resposta o fator de rendimento e a produtividade volumétrica de etanol. Os níveis das variáveis estudadas encontram-se apresentados na Tabela 9.

A análise das respostas foi realizada utilizando-se o programa STATISTICA for Windows (StatSoft, Inc. V.5 Tulsa, OK, USA). Os resultados foram expressos em gráficos de Pareto, tabelas de análise de variância e nível de significativa (p) e gráficos de contorno e superfície de resposta.

Tabela 9 - Níveis codificados e valores reais do planejamento de experimentos 2^2 com três pontos centrais, para variáveis independentes vazão de aeração (ml/min) e massa de suporte com células imobilizadas (g), no processo de produção de etanol por células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado.

Variáveis independentes	(+1)	0	(-1)
(A) Vazão de aeração (ml/min)	200	125	50
(B) Massa de suporte (g)	200	150	100

Fonte: Arquivo pessoal

4.6.4 Avaliação do desempenho do sistema de bateladas repetidas

Foram realizadas operações em bateladas consecutivas com reutilização das células imobilizadas.

Preencheu-se inicialmente o reator com esferas de aço inoxidável (100g) para redução de tamanho e aumento da área superficial de bolhas de ar. Inseriu-se no reator 200 g de suporte com células imobilizadas (condições de imobilização conforme item 4.5.3) e configurou-se o sistema de aeração para vazão de 200 ml/min. Recirculou-se 1,8L de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado e suplementado (5 g/l de sulfato de amônio, 3 g/l de extrato de levedura e 3 g/l de extrato de malte) na vazão de 50,8 ml/s, junto a inserção de 1,5 ml de antiespumante (emulsão de silicone) e 1,193 g do antibiótico Ceftriaxona sódica hemieptaidratada, para prevenção de contaminação do meio por bactérias. Recirculou-se água a 30°C no encamisamento do reator em todo tempo de fermentação, de modo a conduzir-se a fermentação nesta temperatura. Cada batelada foi conduzida por 48h, sendo o reator descarregado ao final de cada fermentação, com as esferas contendo células imobilizadas mantidas em seu leito e o meio fermentativo succionado por meio de bomba peristáltica. Após o fim de cada processo processo, um novo meio de fermentação com nova carga de antibiótico e anti-espumante foi adicionado ao reator por meio de bomba peristáltica. Todas estas etapas foram conduzidas por tubulações previamente esterilizadas. Amostras foram coletadas periodicamente para determinação das concentrações de açúcares, etanol e produção de biomassa.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Determinação da concentração celular

A concentração de biomassa livre (células livres) foi determinada por turbidimetria utilizando espectrofotômetro (BECKMAN 640B), a 600 nm, e correlacionada com o peso seco de células (g/l) por meio de uma curva de calibração correspondente. As medidas foram feitas em suspensões celulares devidamente diluídas, após centrifugação, lavagem e ressuspensão das células em água destilada.

A determinação das concentrações de células imobilizadas nas esferas de gel de alginato de cálcio foram determinadas por espectrofotometria (BECKMAN 640B), a 600 nm, e correlacionada com o peso seco de células (g/l) utilizando-se uma curva de

calibração correspondente. As esferas de gel contendo as células foram dissolvidas em vórtex pela adição de citrato de potássio (2%) em uma proporção de 1 ml de citrato para 8 esferas de gel contendo as células, conforme metodologia adaptada de Carvalho et. al., (2002). A suspensão obtida foi centrifugada à 2000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em água destilada e devidamente diluídas para determinação de sua concentração.

4.7.2 Microfotografias das células imobilizadas em alginato de cálcio

As microfotografias foram feitas por meio de corte de sessão de pellets das células imobilizadas em alginato de cálcio e coradas em azul de metileno, em microscópio óptico.

4.7.3 Determinação da variação no diâmetro das esferas de gel de alginato de cálcio

A variação no diâmetro das esferas de alginato de cálcio foi acompanhada visando-se avaliar a estabilidade do suporte com células imobilizadas diante das condições utilizadas experimentalmente. Uma amostragem de 10 esferas foram coletadas ao acaso e medidas utilizando-se um paquímetro de precisão de 0,05 mm. O diâmetro médio das esferas foi então determinado pela média aritmética dos diâmetros avaliados.

4.7.4 Determinação dos teores de açúcares, etanol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural

A determinação das concentrações de glicose, arabinose, xilose, ácido acético e etanol foram verificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo SCHIMADZU-LC 10 AD (Kyoto – Japão), equipado com coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), acoplado a um detector de índice de refração RID-6A, com eluente ácido sulfúrico 0,01N a um fluxo de 0,6 µl/min, temperatura da coluna de 45 °C e volume de amostra injetado de 20µl. Antes de se efetuar as leituras em HPLC, as amostras foram filtradas em filtro Sep Pak C18.

A determinação do teor de furfural e hidroximetilfurfural no hidrolisado foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo SCHIMADZU-LC 10 AD (Kyoto – Japão), equipado com coluna HP-RP18 (200 x 4,6mm), acoplado a um detector de ultravioleta SPD-10A UV-VIS, com eluente acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético, com um fluxo de 0,8 ml/min,

comprimento de onda de 276 nm, temperatura da coluna de 25 °C e volume de amostra injetado de 20 µl. Antes de se efetuar as leituras em HPLC, as amostras foram filtradas em membranas MINISART 0,22µm (SARTORIUS).

4.8 PARÂMETROS FERMENTATIVOS

a) Fator de rendimento de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$, g etanol / g xilose) (*Equação 15*).

$$Y_{P/S} = \Delta P / \Delta S = (P_f - P_i) / (S_i - S_f) \quad (15)$$

Na qual: P_f = concentração final de etanol;
 P_i = concentração inicial de etanol;
 S_f = concentração final de açúcares;
 S_i = concentração inicial de açúcares.

b) Produtividade volumétrica em etanol (Q_P , g etanol/ L.h) (*Equação 16*).

$$Q_P = (P_f - P_i) / t \quad (16)$$

Na qual: t= tempo de fermentação.

c) Fator de rendimento de açúcares em biomassa livre ($Y_{X/S}$, g biomassa livre /g xilose) (*Equação 17*).

$$Y_{X/S} = -\Delta X / \Delta S = (X_f - X_i) / (S_f - S_i) \quad (17)$$

Onde: X_f = concentração final de células livres;

X_i = concentração inicial de células livres;

d) Produtividade volumétrica em biomassa livre (Q_x , g biomassa livre/L.h) (*Equação 18*).

$$Q_x = (X_f - X_i) / t \quad (18)$$

Na qual: X_f = concentração final de biomassa ; X_i =concentração inicial de biomassa ;
(Equação 19).

e) Consumo de Açúcares

$$\% \text{ de consumo de açúcares} = 100 - (S_f/S_i)*100 \quad (19)$$

Onde: S_f = concentração momentânea de açúcares

S_i =concentração inicial de açúcares

e) Concentração de células imobilizadas em função do volume de reator (X_m , g/l)
(Equação 20).

$$X_m = (X \cdot V_m) / V_t \quad (20)$$

Onde: X = concentração de células imobilizadas;

V_m = volume de meio;

V_t = volume total.

* OBSERVAÇÃO: O final do processo, momento no qual foram calculados os parâmetros fermentativos em todos ensaios deste trabalho, foi considerado como o tempo de obtenção de maior concentração de etanol e a concentração de açúcares (Substrato: concentração de xilose somado a de glicose) atingiu um valor menor ou igual a 10% do valor inicial.

4.9 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE ETAPAS DA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO

A Figura 19 apresenta um diagrama esquemático referente às principais etapas da execução deste trabalho.

Figura 19. Diagrama esquemático de etapas da execução deste trabalho

Fonte: Arquivo pessoal

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* empregado neste trabalho foi caracterizado quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas. A tabela 10 apresenta os resultados obtidos, bem como dados da literatura pertinente.

Tabela 10 - Composição percentual de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* de diferentes origens

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Extrativos (%)	Cinzas (%)	Origem do bagaço	Referência
39,52	25,63	30,36	2,9	1,22	Sertãozinho - SP- Brasil	<i>Presente trabalho</i>
42,80	25,90	22,10	6,1	1,4	Cia. Acucareira Vale do Rosario – Ribeirão Preto- SP- Brasil	SILVA et al., (2010).
45,50	27,00	21,10	4,60	n/d	Usina Central Olho D'A'gua, Camutanga, - PE- Brasil	ROCHA et al., (2011).
43,80	27,00	22,60	3,90	2,00	Usina de açúcar do Sudão	MARTÍN et al., (2011).
45,00	26,00	20,00	n/d	2,10	CERF (Centro de Teste de Pesquisa e Formação em cana) - França	BOUSSARSAR; ROGÉ; MATHLOUTH, (2009).
38,90	26,20	23,90	11,00	n/d	Engenho açucareiro de Mante, Tamaulipas, México	AGUILAR et al., (2002).

Continua

Conclusão

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Extrativos (%)	Cinzas (%)	Origem do bagaço	Referência
38,96	23,78	34,15	9,02	0,62	CTC -9	PHILIPPINI, (2012).
39,31	23,00	33,23	10,70	0,58	CTC Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba SP-Brasil	
42,80	24,71	33,20	9,38	0,80		
40,58	23,48	33,55	11,07	0,75		
42,53	25,37	34,42	11,05	0,65		

n/d. não detectado

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Tabela 10, a composição do bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho é compatível com resultados encontrados na literatura. A porcentagem de celulose foi de 39,52%, enquanto o maior valor apresentado na tabela 10 foi de 45,5 %, encontrado no trabalho de Rocha et al. (2011), e o menor valor apresentado foi 38,9%, observado por Aguilar et al. (2002). Quanto a hemicelulose do bagaço deste trabalho, verificou-se composição de 25,63%, enquanto o maior valor apresentado na Tabela 10 foi de 27%, encontrados por Rocha et al. (2011) e Martín et al., (2011), e o menor valor de 23,48% foi verificado por Philippini (2012), na variedade RB86-7515. Já o teor de lignina observado na caracterização desta matéria-prima foi de 30,36%, sendo que o maior e o menor valor apresentados na Tabela 10 foram de 34,42% e 20%, apresentados por Philippini (2012) (CT99-1902) e Boussarsar, Rogé e Mathlouth (2009), respectivamente. De acordo com Canilha et al. (2012), para o bagaço de cana-de-açúcar brasileiro, as concentrações de celulose se encontram em faixas de 38 à 46%, hemicelulose em 19 à 32%, lignina em 19 à 31% e cinzas e extrativos entre 1,0 à 3% e 6 à 9%, respectivamente. Por exemplo, pode-se citar o trabalho de Philippini (2012), onde o autor avalia os níveis composicionais de diferentes variedades de bagaço de cana *in natura*. Entre as diferentes variedades de bagaço analisado, este autor relata faixas composicionais de hemicelulose de 23% a 25,7%, celulose de 38,96% a 42,80%, lignina de 33,2% à 34,15%, cinzas de 0,58% à 0,80% e extrativos de 9,02% à 11,07% . De uma forma geral, existe uma variação entre

as concentrações de biomassas individuais da mesma espécie, dependendo da idade do vegetal, fatores genéticos e as condições de crescimento, como por exemplo, fatores climatológicos e geográficos (CANILHA et al., 2012).

5.2 PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO RESULTANTE

Após o processo de hidrólise ácida, tanto o hidrolisado hemicelulósico, quanto a porção sólida (celulignina) foram analisadas quanto a concentração de seus principais compostos. Observou-se que a celulignina remanescente apresentou: 46,92% de celulose, 7,22% de hemicelulos, 45,09% de lignina e 3,21% de cinzas. Na Figura 20 observa-se uma comparação entre as concentrações dos principais constituintes do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e após o tratamento ácido com ácido sulfúrico.

Figura 20 - Comparação percentual composicional entre as frações dos principais compostos do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e após o tratamento ácido com ácido sulfúrico.

Fonte: Adaptado de Antunes et al., (2014).

Após o pré-tratamento ácido, observou-se uma redução de aproximadamente 72% da hemicelulose. Em trabalho semelhante, Philippini (2012), pré-tratando variedades de bagaço de cana *in natura* também observou redução entre 65% à 85% da hemicelulose em seus ensaios. Segundo Alvira et al. (2010), após a hidrólise ácida, o bagaço de cana-de-

açúcar é modificado estruturalmente. De fato, estas modificações podem ser observadas, por imagens de microscopia eletrônica de varredura do bagaço *in natura* e pré-tratado (Figura 21).

Figura 21- Microfotografias de microscópica eletrônica de varrimento (MEV) da superfície do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (A) e após (B) pré-tratamento ácido. (A1) / (B1), (A2) / (B2), e (A3) / (B3) são referentes a ampliações de 5000, 1000 e 500, e vezes, respectivamente.

Fonte: Antunes et al., (2014).

De acordo com a Figura 21, observa-se que o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* possui homogeneidade em suas fibras, apresentando estrutura rígida, entretanto verifica-se a ruptura e a desfibrilação após o processo de pré-tratamento ácido, além de quebras encontradas em suas partes superiores, devido ao ataque ácido e remoção da hemicelulose.

A porção líquida solubilizada (hidrolisado hemicelulósico), bem como o hidrolisado concentrado e destoxificado, foram caracterizadas quimicamente quanto a

concentração de açúcares como glicose, xilose, arabinose e inibidores, como ácido acético, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, e os resultados são apresentados na tabela 11.

Tabela 11 - Concentrações dos principais constituintes do hidrolisado bruto, concentrado e destoxificado.

Composto	Hidrolisado Bruto (g/l)	Hidrolisado Concentrado (3 vezes) (g/l)	Hidrolisado Destoxificado (g/l)
Glicose	n/d	0,39	0,31
Xilose	10,90	37,43	31
Arabinose	n/d	2,72	2,31
Ácido Acético	0,53	1,83	1,26
HMF	$5,7 \cdot 10^{-03}$	$1,0 \cdot 10^{-03}$	$5,0 \cdot 10^{-04}$
Furfural	$2,36 \cdot 10^{-02}$	$2,0 \cdot 10^{-03}$	$1,0 \cdot 10^{-03}$

n/d. não detectado

Fonte: ANTUNES et al., (2014).

De acordo com a Tabela 11, verifica-se que as condições de hidrólise ácida empregadas proporcionaram um hidrolisado com uma concentração de xilose significativamente maior em relação à glicose (concentração inferior ao limite de detecção do HPLC), indicando a maior susceptibilidade da hemicelulose à hidrólise ácida sob estas condições em relação à celulose. Este comportamento está de acordo com a literatura, devido à estrutura da hemicelulose ser mais facilmente hidrolisada que a da celulose (FENGEL; WENEGER, 1983). Comportamento semelhante foi obtido por Milessi et al. (2012), observando valores semelhantes de açúcares em seu hidrolisado (12,45 g/l de xilose, e 0,67 g/l de glicose) a partir de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando as mesmas condições de pré-tratamento. Cheng et al. (2008) também avaliaram o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, porém de plantações da província de Guangxi, no sul da China. Neste experimento a biomassa (10% m/m) foi pré-tratada com ácido sulfúrico diluído (1,25% m/m) em autoclave a 121 °C durante 2 horas. A composição do hidrolisado encontrado foi de 17,1 g/l de xilose, 7,2 g/l de glicose, 2,0 g/l de arabinose, 0,5 g/l de celobiose, 4,0 g/l de ácido acético e 1,4 g/l de furfural. Em outro exemplo, avaliando condições de hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar utilizando ácido fosfórico, Carvalho et al. (2004) realizou um planejamento de experimentos para investigação de condições otimizadas para este processo. Neste trabalho, os autores obtiveram

concentração máxima de 17,1 g/l de xilose quando a matéria-prima foi tratada a 160° C durante 60 minutos, utilizando-se 70 mg de ácido fosfórico ácido por grama de matéria seca do bagaço.

Para o cálculo do fator de severidade considerando as condições deste pré-tratamento (121°C por 20 minutos), segundo a relação proposta de Overend e Chornet (1988), observou-se um valor de log (Ro) de 1,91. Observa-se que este valor não é elevado, segundo a literatura, em virtude dos baixos valores de temperatura e tempo utilizados no processo. Por exemplo, Scordia et al. (2010) estudaram a hidrólise ácida de biomassa *Saccharum*, utilizando 5% m/m de ácido oxálico diluídos. Neste investigação, os autores verificaram log (Ro) de 3,46 e 2,93, nas condições de 170 °C e 25 min, e 158,1°C e 16,07 min, respectivamente, sendo que nas condições de 190°C e 25 min, este valor foi de 4,05.

O hidrolisado bruto quando concentrado por evaporação à vácuo apresentou variações na concentração de todos seus compostos. A concentração de xilose presente no hidrolisado bruto (10,09 g/l) aumentou cerca de 3,5 vezes após evaporação sob vácuo (37,43 g /L). A não detecção de glicose e arabinose no hidrolisado bruto pode ser atribuída à origem e tipo de bagaço de cana-de-açúcar utilizado no pré-tratamento. Entretanto, após a concentração, observou-se valores de 0,39 e 2,72 g/l de glicose e arabinose, indicando que ambos estavam presentes no hidrolisado bruto, porém em níveis inferiores ao de detecção da análise por cromatografia. Nesta etapa a razão xilose/ glicose foi de 95 vezes maior, fato desejável, uma vez que a presença de açúcares hexose pode prejudicar o metabolismo das pentoses, devido à repressão catabólica exercida por este açúcar (YOUNG; LEE; ALPER, 2010). Ressalta-se que a baixa temperatura utilizada na etapa de concentração foi fundamental para aumentar a concentração de xilose, sem degradação do açúcar. A concentração de furfural também foi reduzida após o processo de concentração, possivelmente, devido à volatilidade do composto a temperatura do processo.

O processo de concentração seguido de destoxificação por *overliming* associado ao uso de carvão ativo mostrou-se eficaz na remoção dos inibidores, reduzindo os níveis de furfural e hidroximetilfurfural do hidrolisado bruto para o hidrolisado tratado de 0,0057 g/l para 0,00059 g/l e 0,0236 g/l para 0,001 g/l, respectivamente. Segundo Van Zyl, Prior e Du Preez (1988), esta remoção deve-se a que alguns compostos inibitórios são associados a íons de cálcio bivalentes, e consequentemente precipitados. Em outro trabalho, Hande,

Mahajan e Prabhune (2012), também após o processo de hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar relataram a presença de 0,43 g/l de hidroximetilfurfural e 0,03 g/l de furfural.

No entanto, notou-se uma pequena perda de açúcar e ácido acético quando comparado o hidrolisado concentrado e destoxificado (redução de 19,3 % de glicose, 17,1% de xilose, 15,2 % de arabinose e 30% de ácido acético), fato esperado devido a precipitações ocasionadas pelo processo. Concomitantemente, Nigam et al. (2000a), também tratando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, apenas com a elevação de pH a 10 usando Ca(OH)_2 e reduzindo-o em seguida, observou perda de 9% para glicose, 3% para xilose e 8% para L-arabinose.

Ressalta-se que a redução da concentração de ácido acético foi em torno de 30%, entretanto sua concentração de 1,269 g/l encontra-se em valor não considerado inibitório à fermentação. Hande, Mahajan e Prabhune (2012) também relataram a presença de 2,7 g/l de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico, após o processo de hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar. Segundo Phowchinda, Délia-Dupuy e Strehaiano (1995), o efeito inibitório do ácido acético mostra-se mais efetivo na síntese de biomassa do que na produção de etanol. Já Chandel et al. (2007) relataram que apenas concentrações entre 2 a 5 g/l oferecem inibição ao metabolismo das leveduras. Entretanto, de uma forma geral, a concentração de tolerância dos microrganismos a esse ácido pode variar de acordo com as espécies e com as condições de cultivo empregadas (PHOWCHINDA; DÉLIA-DUPUY; STREHAIANO, 1995).

De acordo com Martinez et al. (2000), o processo de *overliming* com Ca(OH)_2 não alterou as concentrações de ácidos orgânicos como ácido acético, fórmico e levulínico. Segundo Palmqvist e Hahn-Hagerdal (2000b), a presença simultânea dos compostos inibitórios possui maior efeito inibitório sobre o metabolismo da levedura do que a presença individual destes compostos.

A hidrólise ácida utilizada, bem como o processo de destoxificação resultaram em um hidrolisado rico em açúcares fermentescíveis, com uma baixa quantidade de compostos inibidores ao metabolismo microbiano e com potencial elevado para ser aplicado em processo de fermentação. Esta associação do uso do *overliming* e carvão ativo, utilizada por Alves et al. (1998) mostra-se bastante efetivo e tem sido amplamente utilizado por pesquisadores para destoxificação de hidrolisado hemicelulósico, como por exemplo nos

trabalhos de Santos et al. (2005), Carvalho, Canilha e Silva et al. (2008), Sarrouh e Silva (2010), Milessi et al. (2012) e Chandel et al. (2014).

5.3 SELEÇÃO DE MEIO NUTRICIONAL PARA A LEVEDURA *S. shehatae* UFMG-HM 52.2

Foram testados diferentes meios nutricionais para a seleção do meio de fermentação a ser utilizado nos estudos consequentes empregando a levedura *S. shehatae* UFMG HM 52.2. O critério de escolha dos meios para estudo foram baseadas na simplicidade, custo e eficiência, sendo testado condições estabelecidas pelos trabalhos de Parekh, Yu e Wayman (1986), Ge et al. (2011), e Sun e Tao (2010), referentes a diferentes linhagens da levedura *S. shehatae*. O perfil fermentativo destes ensaios é apresentado na Figura 22.

Figura 22. Consumo de açúcares, produção de etanol e biomassa em função do tempo pela levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado por diferentes meios nutricionais. Experimentos foram conduzidos em duplicatas, sendo que o desvio padrão se encontrou abaixo de 5%. Composição do meio A - 5g/l de sulfato de amônio, 3g/l de extrato de levedura, 3g/l de extrato de malte (PAREKH; YU; WAYMAN,1986); Composição do meio B -5g/l de peptona, 3g/l de extrato de levedura, 3g/l de extrato de malte (PAREKH; YU; WAYMAN,1986); Composição do meio C - 1,73 g/l de sulfato de amônio, 3,56 g/l de KH_2PO_4 , 2,62 g/l de extrato de levedura (GE et al., 2011); Composição do meio D - 3 g/l de extrato de levedura, 0,25 g/l de Uréia, 0,25 g/l de cloreto de cálcio, 0,25 g/l de sulfato de Magnésio e 2,5 g/l de KH_2PO_4 (SUN;TAO, 2010).

Fonte: Adaptado de Antunes et al., (2014).

De acordo com a Figura 22, a máxima concentração de etanol obtida em 48 h foi de 9,2; 9,6; 9,6 e 5,53 g/l para os experimentos conduzidos com os meios 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Os resultados quanto ao fator de rendimento e a produtividade volumétrica em etanol para cada experimento podem ser observados na figura 23.

Figura 23. Fator de rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) do processo de fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 utilizando diferentes meios nutricionais. Os resultados são médias de duplicatas, sendo que o desvio padrão se encontrou abaixo de 5%. Meio 1 - 5g/l de sulfato de amônio, 3g/l de extrato de levedura, 3g/l de extrato de malte (PAREKH; YU; WAYMAN,1986); Meio 2 - 5g/l de peptona, 3g/l de extrato de levedura, 3g/l de extrato de malte (PAREKH; YU; WAYMAN.,1986); Meio 3 - 1,73 g/l de sulfato de amônio, 3,56 g/l de KH_2PO_4 , 2,62 g/l de extrato de levedura (GE et al., 2011) e meio 4 - 3 g/l de extrato de levedura, 0,25 g/l de Uréia, 0,25 g/l de cloreto de cálcio, 0,25 g/l de sulfato de Magnésio e 2,5 g/l de KH_2PO_4 (SUN; TAO, 2010).

Fonte: Adaptado de Antunes et al, (2014).

De acordo com a Figura 23, observa-se nos experimentos 1, 2 e 3, resultados semelhantes para o fator de rendimento (Meio 1 - 0,380 g/g; Meio 2 - 0,364 g/g; Meio 3 - 0,367 g/g) e produtividade volumétrica em etanol (Meio 1 - 0,190 g/l.h; Meio 2 - 0,200 g/l.h; Meio 3 - 0,202 g/l.h), com o meio 4 apresentando resultados inferiores ($Y_{P/S}$: 0,226 g/g; Q_P : 0,115 g/l.h). Em todos os ensaios verificou-se consumo próximo a 100% do açúcar inicial (Meio 1: 100%; Meio 2: 99,84%; Meio 3: 99,79%; Meio 4: 100%) (Figura 22). Considerando-se que as leveduras requerem uma variedade de substâncias para a síntese de material celular e de energia, tais como carbono, oxigênio, nitrogênio, dentre outros, a presença destes nutrientes é essencial para o desempenho eficiente de um microrganismo em processos de fermentação (ANTUNES et al., 2014). Após 48 h de fermentação,

observou-se redução na concentração de etanol em todos os ensaios (Figura 22). Este comportamento pode ser atribuído ao consumo total de açúcares fermentescíveis após este tempo de fermentação e à sua utilização pelas células como fonte de carbono para a manutenção celular e excreção de etanol. O consumo de etanol após o esgotamento de açúcares é uma característica comum da levedura *S. shehatae*, comportamento também já verificado em trabalhos anteriores com esta linhagem de microrganismo (CHANDEL et al., 2007).

Observou-se que o fator de rendimento e produtividade volumétrica em etanol de ambas fermentações foram significativamente maiores que o fator de rendimento e produtividade volumétrica de biomassa livre presente no meio de fermentação ($Y_{X/S}$ e Q_X - Meio 1: 0,12 g/g e 0,06 g/l.h; Meio 2: 0,11 g/g e 0,07 g/l.h; Meio 3: 0,08 g/g e 0,05 g/l.h; Meio 4: 0,08 g/g e 0,04 g/l.h, respectivamente), evidenciando assim que nestas condições de trabalho o metabolismo da levedura se encontrou direcionado para a produção de etanol.

As fermentações conduzidas pelo meio 1 apresentaram valores de $Y_{P/S}$ de aproximadamente 0,38 g/g e Q_P de 0,19 g/l.h. Utilizando este mesmo meio nutricional em hidrolisado hemicelulósico de aspas de madeira, Parekh, Yu e Wayman (1986) avaliaram a produção de etanol utilizando a levedura *Candida shehatae* ATCC 22984. Neste trabalho, os autores observaram o valor de $Y_{P/S}$ de 0,45 g/g. Ainda que utilizando linhagens e hidrolisados diferentes, não se observou uma larga variação entre os resultados de fator de rendimento de Parekh, Yu e Wayman (1986) e do presente trabalho.

A suplementação do Meio 2, inicialmente empregada por Parekh, Yu e Wayman (1986) para o crescimento celular de *Candida shehatae* ATCC 22984, também foi testada nos ensaios fermentativos com a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, apresentando valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,364 g/g e 0,20 g/l.h, respectivamente. Em outro trabalho, Canilha et al. (2010) também utilizou este meio nutricional para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando células de *Scheffersomyces stipitis* DSM 3651. Neste trabalho os autores observaram valores de $Y_{P/S}$ de 0,30 g/g e Q_P de 0,13 g/l.h. Estes resultados, apesar de obtidos utilizando a levedura *S. stipitis*, também evidenciam o potencial deste meio de enriquecimento nutricional. De fato, meios compostos com extrato de malte apresentam alta eficiência nutricional, uma vez que este composto contém 73,1% de maltose, glicose e frutose (W. CRUEGER; A. CRUEGER, 1993).

Em um outro teste, utilizou-se o meio nutricional 3, proposto por Ge et al. (2011), baseado em resultados otimizados do estudo da produção de etanol por células de *Candida shehatae* HDYXHT-01 a partir de xilose. No presente trabalho, utilizando células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, observou-se valores de $Y_{P/S}$ de 0,38 g/g e Q_P de 0,20 g/l.h, enquanto Ge et al. (2011) verificaram valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,41 g/g e 0,55 g/l.h. Observa-se que os valores de $Y_{P/S}$ foram semelhantes, entretanto verifica-se diferença entre os valores de Q_P , possivelmente porque os autores em sua metodologia, utilizaram meio sintético de fonte carbono e conduziram seus estudos utilizando concentração celular superior a do presente trabalho.

Já as fermentações conduzidas pelo meio 4 apresentaram fator de rendimento de etanol de aproximadamente 0,23 g/g e produtividade volumétrica de 0,12 g/l.h. Este meio foi empregado Sun e Tao (2010), onde os autores avaliaram a produção de etanol por *Candida shehatae* CICC 1766 a partir de hidrolisado de palha de arroz. Neste trabalho os autores verificaram $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,31 g/g e 0,175 g/l.h (pH 5,5), respectivamente. Observou-se para este meio nutricional, que as células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 não apresentaram significativa produção de etanol, quando comparado aos demais testes e ao trabalho de Sun e Tao (2010). Esta não adaptação pode ter sido em função de uma possível carência de nitrogênio de forma assimilada pelas células. Ressalta-se que este foi o único experimento que o meio composicional não possui peptona ou sulfato de amônio, compostos que contém cerca de 11% (Vetec Química fina) e 21% (Isquisa Químicas) de nitrogênio total em sua composição, respectivamente. Em todos os meios testados pelos diferentes autores, bem como em outros trabalhos, como o de Chandel et al. (2007), observa-se o uso de extrato de levedura para suplementação nutricional, o qual contém cerca de 12,0% de nitrogênio total (Synth). Dessa forma, este composto mostrou-se ser fundamental para suplementação de hidrolisados hemicelulósicos utilizando células de *S. shehatae*. Concomitantemente, investigando a produção de etanol por suco de caju utilizando a levedura *Saccharomyces diasticus*, Maruthai, Thangavelu e Kanagasabai (2012) verificaram que o extrato de levedura e o sulfato de amônio apresentavam efeito mais significativo entre nutrientes para fermentação alcoólica.

Em todos os ensaios fermentativos deste trabalho, foi verificado pequena concentração de L-arabinose (ordem de 2 g/l), entretanto observou-se o não consumo deste carboidrato pelas células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2. Este fato também já é reportado

por Spencer-Martins (1984), sendo que os autores verificaram em células de *S. shehatae* a assimilação de xilose e não consumo de arabinose. Du Preez, Bosch e Prior (1986) também reportaram a não produção de etanol por células de *S. shehatae* quando a arabinose foi utilizada como fonte de carbono principal.

Observou-se em todos experimentos, o aumento de pH de 5,5 (0 h), para cerca de 6,9 (48 h) ao decorrer da fermentação, fato também reportado por Milessi (2012). Este comportamento foi verificado, possivelmente, pelo consumo de ácido acético em todos experimentos. Ressalta-se que a concentração inicial deste ácido se encontrava em cerca de 1,0 g/l no tempo inicial de fermentação em todos experimentos, tendo oscilações em torno deste valor durante o processo fermentativo. Ao fim da fermentação, observou-se redução de 92,5, 71,6, 79,2 e 100 % desse ácido para os experimentos conduzidos com os Meios 1, 2, 3 e 4, respectivamente. De fato, o ácido acético, além de ser um intermediário metabólico, também é relatado como uma possível fonte de carbono utilizado por leveduras (FERRARI et al., 1992). Felipe et al. (1995) também observaram resultados semelhantes, verificando o consumo de ácido acético pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, após sua adaptação em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Evidencia-se que o consumo deste ácido pode ser vantajoso ao processo, com a redução da concentração de sua forma não dissociada, o qual é responsável pela sua toxicidade (LOHMEIER-VOGEL et al., 1998).

Desta forma, baseado nos resultados, em sua simplicidade e custo, bem como que as condições utilizadas direcionaram o metabolismo da levedura para a produção de etanol, estabeleceu-se o meio número 1, proposto por Parekh, Yu e Wayman (1986), para ser utilizado nas fermentações seguintes deste trabalho. Chandel et al. (2013) também avaliou a produção de etanol utilizando esta suplementação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido por hidrólise ácida mediada por ácido oxálico, utilizando esta mesma levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2. Neste experimento, os autores observaram valores $Y_{P/S}$ de 0,35 g/g, cerca de 92% do fator de rendimento obtido no presente trabalho, demonstrando o potencial do meio de fermentação utilizado. De acordo com Ananda, Vadlani e Madl (2011), a utilização de nutrientes de baixo custo pode diminuir o custo de produção do etanol, uma vez que fontes de nitrogênio podem representar até 50% do custo de produção.

Segundo Joshi et al. (2011), a levedura *S. shehatae* é capaz de converter tanto açúcares pentoses quanto hexoses em etanol e outros produtos de valor agregado com elevados rendimentos. Por exemplo, Chandel et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes a deste trabalho para a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando a levedura *Candida shehatae* NCIM 3501, porém utilizando um meio diferente destes investigado (0,5 g/l de NH_4Cl ; 2 g/l de KH_2PO_4 ; 0,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,5 g/l de extrato de levedura, 0,1 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l de $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,001 g/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5.5) para a produção de etanol. Nesta investigação, os autores observaram valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,3 g/g 0,21 g/l.h, respectivamente. Ressalta-se que em estudos preliminares desta levedura *S. shehatae*, na década de 80, autores já relatavam que este microrganismo convertia xilose a etanol com um fator de rendimento superior a demais leveduras fermentadoras de pentoses estudadas na época (DU PREEZ; VAN DER WALT, 1983; DU PREEZ; PRIOR; MONTEIRO, 1984; DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986).

5.4. DEFINIÇÃO DE CONDIÇÕES DE IMOBILIZAÇÃO

5.4.1 Avaliação da influência das variáveis concentração de alginato de sódio, de cloreto de cálcio e tempo de cura para a produção de etanol de segunda geração utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 pelo método de aprisionamento em gel

Neste trabalho, investigou-se variáveis no processo de imobilização celular da levedura *S. shehatae* UFMG HM 52.2 em matriz de alginato de cálcio, como concentração de alginato de sódio, cloreto de cálcio e tempo de cura, visando avaliar sua influência no fator de rendimento e produtividade volumétrica em etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Os intervalos entre 1% a 2% para concentração de alginato de sódio, 0,1 M a 0,2 M de concentração de cloreto de cálcio e 12 h a 24 h, para o tempo de cura foram definidos baseados em condições encontradas na literatura relatadas à esta técnica (CARVALHO et al., 2002; MILESSI, 2012; SARROUH; SILVA, 2013).

A determinação dos efeitos destas variáveis foi realizada por meio de planejamento fatorial completo do tipo 2^3 completo com três ensaios no ponto central. Foram consideradas variáveis resposta o fator de rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica

em etanol (Q_P). A tabela 12 apresenta os valores codificados e reais das variáveis estudadas, bem como os resultados das variáveis resposta para cada experimento.

Tabela 12 -Níveis codificados e valores reais das variáveis independentes (A) concentração de alginato de sódio, (B) concentração de cloreto de cálcio e (C) tempo de cura e resultados das variáveis resposta fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) para cada ensaio do planejamento estatístico 2^3 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de imobilização de células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, visando a produção de etanol por a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Experimento	Valores codificados			Valores reais			Variáveis Respostas	
	(A)	(B)	(C)	(A) (%m/v)	(B) (mol/l)	(C) (h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/l.h)
1	-1	-1	-1	1	0,1	12	0,238	0,118
2	1	-1	-1	2	0,1	12	0,245	0,082
3	-1	1	-1	1	0,2	12	0,320	0,146
4	1	1	-1	2	0,2	12	0,198	0,131
5	-1	-1	1	1	0,1	24	0,215	0,104
6	1	-1	1	2	0,1	24	0,309	0,142
7	-1	1	1	1	0,2	24	0,182	0,108
8	1	1	1	2	0,2	24	0,306	0,149
9	0	0	0	1,5	0,15	18	0,271	0,118
10	0	0	0	1,5	0,15	18	0,289	0,129
11	0	0	0	1,5	0,15	18	0,329	0,125

Fonte: Arquivo pessoal

Observou-se neste planejamento de experimentos variações de valores de $Y_{P/S}$ de aproximadamente 0,15 g/g, sendo encontrado o valor mínimo de 0,182 g/g no experimento 7 (1% de alginato de sódio, 0,2 M de cloreto de cálcio e 24 h de tempo de cura) e o maior valor de cerca de 0,329 g/g para o experimento 11. Para a variável resposta Q_P , esta variação encontrada foi de aproximadamente 0,06 g/l.h, sendo o valor mínimo de 0,082 g/l.h encontrado no experimento 2 (2% de alginato de sódio, 0,1M de cloreto de cálcio e 12 h de tempo de cura) e o maior valor de cerca de 0,149 g/g para o experimento 8 (2% de alginato de sódio, 0,2M de cloreto de cálcio e 24 h de tempo de cura). Observou-se também, que para o consumo superior a 90% dos açúcares e maior produção de etanol, o tempo de fermentação variou de 48 a 96 h, conforme apresentado na Figura 24.

Figura 24 - Perfil de consumo de açúcares e produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, imobilizada em diferentes condições (de acordo com a Tabela 12).

Fonte: Arquivo Pessoal

Ressalta-se que apenas os experimentos 4 (2% de alginato de sódio, 0,2M de cloreto de cálcio e 12 h de tempo de cura) e 7 (1% de alginato de sódio, 0,2M de cloreto de cálcio e 24 h de tempo de cura) o maior fator de rendimento em etanol foi obtido em 48 horas. Apenas o experimento 2 (2% de alginato de sódio, 0,1M de cloreto de cálcio e 12 horas de tempo de cura), este parâmetro foi alcançado em 96 h de fermentação, enquanto para todos os demais experimentos, incluindo os três pontos centrais, em 72 h de fermentação. Os resultados foram analisados estatisticamente quanto aos valores obtidos das variáveis resposta. Os níveis de significância destas variáveis e suas interações podem ser observados na no gráfico de Pareto na Figura 25 e pela análise de variância (ANOVA) apresentada na tabela 13.

Figura 25 - Gráfico de pareto com as variáveis dependentes fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes (A) Concentração de alginato de sódio, (B) Concentração de cloreto de cálcio e (C) tempo de cura, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^3 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de imobilização de células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Arquivo Pessoal

Tabela 13 - Análise de variância para as variáveis dependentes fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes (A) Concentração de alginato de sódio, (B) Concentração de cloreto de cálcio e (C) tempo de cura, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^3 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de imobilização de células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

$Y_{P/S}$					
	SS	df	MS	F	p
Alginato de sódio (A)	$1,33. 10^{-03}$	1	$1,33. 10^{-03}$	$5,71. 10^{-01}$	$4,92. 10^{-01}$
Cloreto de cálcio (B)	$1,25. 10^{-07}$	1	$25. 10^{-07}$	$5,39. 10^{-05}$	$9,94. 10^{-01}$
Tempo de cura (C)	$1,51. 10^{-05}$	1	$1,51. 10^{-05}$	$6,52. 10^{-03}$	$9,40. 10^{-01}$
A x B	$1,23. 10^{-03}$	1	$1,23. 10^{-03}$	$5,28. 10^{-01}$	$5,08. 10^{-01}$
A x C	$1,39. 10^{-02}$	1	$1,39. 10^{-02}$	$5,97. 10^{+00}$	$7,09. 10^{-02}$
B x C	$6,30. 10^{-04}$	1	$6,30. 10^{-04}$	$2,71. 10^{-01}$	$6,30. 10^{-01}$
Erro	$9,28. 10^{-03}$	4	$2,32. 10^{-03}$		
Total SS	$2,63 10^{-02}$	10			
$R^2: 0,647$					
Q_P					
	SS	df	MS	F	p
Alginato de sódio (A)	$9,80. 10^{-05}$	1	$9,80. 10^{-05}$	$3,65. 10^{+00}$	$1,29. 10^{-01}$
Cloreto de cálcio (B)	$9,68. 10^{-04}$	1	$9,68. 10^{-04}$	$3,60. 10^{+01}$	$3,87. 10^{-03*}$
Tempo de cura (C)	$8,45. 10^{-05}$	1	$8,45. 10^{-05}$	$3,15. 10^{+00}$	$1,51. 10^{-01}$
A x B	$7,20. 10^{-05}$	1	$7,20. 10^{-05}$	$2,68. 10^{+00}$	$1,77. 10^{-01}$
A x C	$2,11. 10^{-03}$	1	$2,11. 10^{-03}$	$7,87. 10^{+01}$	$8,92. 10^{-04*}$
B x C	$5,45. 10^{-04}$	1	$5,45. 10^{-04}$	$2,03. 10^{+01}$	$1,08. 10^{-02*}$
Erro	$1,07. 10^{-04}$	4	$2,69. 10^{-05}$		
Total SS	$3,99. 10^{-03}$	10			
$R^2: 0,973$					

* Fatores significativos

Fonte: Arquivo Pessoal

De acordo com a análise estatística, para 95% de confiança, nenhuma das variáveis foi significativa para a variável resposta $Y_{P/S}$ ($p < 0,05$), em um modelo de primeira ordem ($R^2: 0,647$). Verificou-se que o parâmetro que mais se aproximou de ser significativo a este intervalo de confiança foi a interação de segunda ordem entre as variáveis concentração de alginato de sódio e tempo de cura, sendo esta variável significativa apenas se considerado 90% de confiança.

Entretanto, também para um modelo de primeira ordem ($R^2:0,973$), para a variável resposta Q_P ($p<0,05$), observou-se que estatisticamente para 95% de confiança que a concentração de cloreto de cálcio (B), as interações de segunda ordem entre a concentração de alginato de sódio e tempo de cura (AC) e concentração de cloreto de cálcio e tempo de cura (BC) mostraram-se significante. O modelo de primeira ordem para esta variável dependente, incluindo todas variáveis independentes e suas interações, é apresentado na *Equação 21*.

$$Q_P = 0,1686 - 0,108 (A) + 0,535(B) - 0,0034(C) + 0,12(AB) - 0,0054(AC) - 0,275 (BC) \quad (21)$$

Em uma verificação não apresentada, observou-se que a interação de terceira ordem entre as três variáveis independentes não apresentou resultados significativos, sendo assim, para as duas variáveis resposta ($Y_{P/S}$ e Q_P), procedeu-se o estudo estatístico utilizando-se modelos com apenas as interações de primeira e segunda ordem, de modo a obter-se 4 graus de liberdade, para o cálculo do erro, conforme apresentado na Tabela 13.

Observou-se que a variável concentração de cloreto de cálcio apresentou efeito positivo para Q_P , indicando o uso desta variável em nível alto, na concentração de 0,2M. Este comportamento sugere que a concentração de Ca^{+} apresentou efeito positivo sobre a estrutura das esferas, gerando uma matriz estável capaz de promover eficaz transferência de nutrientes e células com o meio fermentativo. Uma vez identificado o uso em nível alto para esta variável, estudou-se nesta condição, o comportamento da interação das demais variáveis em relação a resposta Q_P . Esta interação significativa pode ser observada pelos gráficos de superfície de resposta (A) e de contorno (B), apresentados na Figura 26.

Figura 26 - Gráfico de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para a variável dependente produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes Concentração de alginato de sódio e tempo de cura (utilizando concentração de 0,2M de cloreto de cálcio), referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^3 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de imobilização de células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, visando a produção de etanol por a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Arquivo pessoal

Observou-se o aumento de Q_P de acordo com a redução da concentração de alginato de sódio e tempo de cura. Considerando este perfil, a figura 27 apresenta o gráfico de superfície de resposta e de contorno, para a interação significativa entre concentração de alginato de sódio e tempo de cura, utilizando 1% de alginato de sódio.

Figura 27 - Gráfico de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para a variável dependente produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes Concentração de cloreto de cálcio e tempo de cura (utilizando a concentração de 1% de alginato de sódio), referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^3 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de imobilização de células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, visando a produção de etanol por a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Arquivo pessoal

Observa-se, que o uso da concentração de cloreto de cálcio em nível alto e o tempo de cura em nível baixo maximiza os valores de Q_P .

Ressalta-se que nenhum dos parâmetros discutidos apresentaram efeitos significativos para $Y_{P/S}$ (Figura 26). Considerando este resultado, a determinação de níveis de variáveis de imobilização empregadas neste trabalho foi baseada somente com os valores referentes a Q_P . Evidencia-se que esta variável mostrou efeitos significativos e modelo matemático válido de primeira ordem, conforme apresentado na *Equação 21*.

Desta maneira, as condições estabelecidas para o processo de imobilização da levedura *S. shehatae* UFMG HM 52.2, visando a produção de etanol por hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, foram: concentração de 1% de alginato de sódio, concentração de 0,2 M de cloreto de cálcio e 12 h de tempo de cura. Observou-se que a interação dos efeitos de alginato de sódio e tempo de cura apresentou o maior valor entre as interações (Figura 25 e Tabela 13), demonstrando a influência destas variáveis na qualidade da formação da matriz porosa.

Evidencia-se que para cada bioprocessos, as melhores condições de imobilização celular são definidas pela interação entre o microorganismo e a técnica de imobilização empregada, bem como com as condições de condução do processo fermentativo, sendo assim, não existindo condições padrões de imobilização. Por exemplo, Milessi (2012), também utilizando esta técnica de imobilização empregando células de *S. stiptis* para produção de etanol, observou valor de $Y_{P/S}$ de 0,29 g/g e Q_P de 0,206 g/l.h em suas condições otimizadas, com o uso de concentração de 2 % de alginato de sódio, concentração de 0,1M de cloreto de cálcio e tempo de cura de 24 h.

Encontram-se também estudos utilizando tratamento com nitrato de alumínio ($Al(NO_3)_3$), como alternativa de gelificação ao tempo de cura para a imobilização celular em matriz de alginato de sódio. Por exemplo, Roca et al. (1995) observaram que o tratamento de *pellets* de alginato com o íon Al_3^+ ($Al(NO_3)_3$ 0,3 M) por 5 minutos após a imobilização garantiu estabilidade e aumentou a resistência das esferas no processo de imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Em outro exemplo, Santana et al. (2009) observaram o valor 2,27 g/l.h de produtividade volumétrica em etanol a partir de glicose, empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em partículas de gel de alginato de sódio a 3% m/v e tratada de $Al(NO_3)_3$ a 0,3M.

De acordo com a literatura não observa-se o uso de altos valores de concentração de alginato de sódio para processos de imobilização celular. Segundo Ogbonna, Amano e Nakamura (1989), ao utilizar-se altas concentrações de alginato, as esferas contendo células imobilizadas podem apresentar problemas de transferência de massa e rompimento durante o tempo de fermentação. Concomitantemente, Omar (1993) reportou que quanto maior a concentração de alginato de sódio empregado na etapa de imobilização, menor é a porosidade do gel, com consequente limitação de transferência de nutrientes. Ressalta-se que a formação de uma camada protetora pode minimizar a inibição das células pelo produto, dessa forma possibilitando o emprego de células imobilizadas por elevados tempos de fermentação e com a possibilidade de bateladas repetidas (IVANOVA, PETROVA E HRISTOV, 2011). Para a formação desta camada de proteção, consequente de uma completa gelificação das esferas, é necessário um tempo de cura ideal após o momento de imobilização, evidenciando a importância do estudo desta variável.

Neste trabalho, observou-se esferas de alginato de cálcio com tamanho médio de 3,8 mm, conforme apresentado na Figura 28.

Figura 28 - Fotografia de esferas de alginato de cálcio com células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2

Fonte: Arquivo pessoal

Segundo Akin (1987), o tamanho do diâmetro de esferas em sistemas imobilizados varia de 0,8 a 5 mm. O tamanho da esfera deve-se aos métodos de imobilização, e é consequente de fatores como diâmetro da agulha, superfície cilíndrica de gotejamento ou tubo de extrusão e altura de queda da gota da solução ao sal. Por exemplo, Santana et al.

(2009), ao imobilizar células de *S. cerevisiae* em alginato de cálcio, observaram o diâmetro de 4,2 mm, enquanto Ksungur e Zorlu (2001) trabalharam com *pellets* de 2,0 a 2,4 mm. Neste presente trabalho, não observou-se redução, nem a fragmentação de esferas de alginato de cálcio após 96 horas de fermentação, evidenciando a qualidade da matriz polimérica formada. Este fato também foi observado por outros autores que utilizaram a mesma técnica de imobilização (PASCOLI et al., 2012; MILESSI. 2012).

Em todos os ensaios, observou-se formação de biomassa livre no meio de fermentação, a partir de 12 horas de fermentação. Este fato ocorreu devido ao desprendimento da biomassa do interior das células de alginato para o meio fermentativo. Este comportamento, segundo Chen e Huang (1988), foi observado devido ao crescimento das células que se encontravam imobilizadas, desprendendo-se para o meio de imobilização pelos poros nas regiões superficiais das esferas. Segundo estes autores, este comportamento ocorreu devido ao crescimento das células no interior das esferas, com a modificação da arquitetura da matriz de alginato de cálcio, levando ao aparecimento de poros semelhantes à “crateras” na região superficial dos *pellets*, que passaram a atuar como “portas de escape” de células para o meio de fermentação. De fato, este comportamento exerceu um papel importante na manutenção da viabilidade e atividade das células imobilizadas, uma vez que novos microrganismos crescem no espaço dos que se desprenderam ao meio fermentativo.

Neste contexto, verifica-se na Figura 29, imagens de microscopia de células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio, bem como a região superficial do suporte.

Figura 29 - Imagens de microscopia de leveduras de *S. shehatae* UFMG 52.2 imobilizadas em alginato de sódio. (Aumento de 400x)

Fonte: Arquivo pessoal

A figura 30 apresenta o aumento da concentração de células livres no meio fermentativo em decorrer do tempo de fermentação, para todos os ensaios relativos ao planejamento de experimentos utilizado.

Figura 30. Perfil da produção de biomassa em forma livre, a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar pela levedura imobilizada *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, em ensaios conduzidos em diferentes condições de imobilização celular (de acordo com a Tabela 12).

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Figura 30, verificou-se a partir de 36 horas de fermentação, em todos experimentos, um perfil de inflexão na curva de células livres em todas as condições testadas. Esse comportamento sugere o momento em que as células livres se adaptam e aumentam sua reprodução no meio fermentativo. Ressalta-se também o crescimento das células no interior das esferas de alginato de cálcio. Observou-se também, para todos experimentos, a média de 0,83 g/l em 0 h e 1,4 g/l em 96 h, de concentração de células imobilizadas por volume do meio de fermentação. Dessa maneira, ressalta-se que produto obtido deve-se a uma bioconversão dos carboidratos a etanol por associação de células livre e imobilizadas.

Outra observação interessante é a constatação da produção de xilitol, que pode estar relacionado com o microambiente da matriz de alginato de cálcio, observado em um nível de concentração de cerca de 2 g/l em todos os ensaios deste planejamento de experimentos. A formação deste composto é normalmente relacionada em fermentações de xilose por leveduras (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998) e pode ser atribuída às limitações de disponibilidade de oxigênio devido à elevada concentração de biomassa em sistemas imobilizados. Este poliálcool é produzido a partir de xilose na primeira etapa do

seu metabolismo, catalisada pela enzima xilose redutase. Sob condições de baixa aeração, um desequilíbrio redox resulta na diminuição na razão $[NAD^+] / [NADH + H^+]$, limitando a taxa de catálise da enzima xilitol desidrogenase, resultando no acúmulo de xilitol e sua consequente excreção a partir das células para o meio fermentativo (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998). Como a limitação de oxigênio é também uma condição necessária para a produção de etanol, a formação de xilitol será inerente nestes casos.

Assim como nos experimentos utilizando células livres, o consumo de ácido acético também foi verificado em todos os experimentos, sendo que no momento em que a concentração de açúcares atingiu um valor menor que 10% do valor inicial, os valores deste ácido se encontravam abaixo de 0,5 g/l e o valor de pH estava na ordem de 6,5. Este comportamento também foi verificado por Santos (2005), utilizando células imobilizadas de *Candida guilliermondii* para produção de xilitol e por Milessi (2012), utilizando células imobilizadas de *S. stiptis* para a produção de etanol.

Neste planejamento de experimentos, observou-se que os maiores valores das variáveis respostas $Y_{P/S}$ e Q_P corresponderam a cerca de 84% e 75% (Ensaio 8) dos valores máximos obtidos utilizando células livres, respectivamente. Este fato, possivelmente ocorreu, pois sistemas com células livres geralmente apresentam valores de fator de rendimento e produtividade volumétrica em etanol um pouco maiores do que os sistemas com células imobilizados, devido à maior disponibilidade de acessibilidade de oxigênio e nutrientes para o microrganismo. Em outro trabalho, Chandel et al. (2013) também utilizou esta levedura, *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 em forma livre, para obter etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido por pré-tratamento ácido com ácido oxálico. Neste experimento, os autores observaram $Y_{P/S}$ de 0,35 g/g, ou seja, valor de fator de rendimento próximo aos valores máximos obtidos no presente planejamento de experimentos. Entretanto, a utilização de células imobilizadas em comparação com células livres apresenta várias características interessantes, como por exemplo a possibilidade de reutilizar as mesmas esferas em bateladas repetidas, evitando e reduzindo etapas essenciais ao sistema não imobilizado.

5.4.1.1. Teste fermentativo utilizando elevada concentração de células no interior das esferas de alginato de cálcio.

Realizou-se um experimento adicional, sob as condições previamente determinadas de imobilização, utilizando maior concentração de células no interior das esferas de alginato de cálcio (6 g/l de concentração celular em solução de alginato de sódio), visando o aumento da produtividade do processo.

O consumo de açúcares, bem como a produção de etanol e de biomassa livre, referente a este experimento, é apresentado na Figura 31.

Figura 31. Perfil de consumo de açúcares e produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar, utilizando a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio com elevada concentração celular (6 g/l de concentração celular em solução de alginato de sódio). O experimento foi realizado em duplicata, sendo que o desvio padrão se encontrou abaixo de 5%.

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Figura 31, observa-se que a máxima concentração de etanol (5,1 g/l) foi obtida em 72 horas de fermentação, correspondentes a valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,15 g/g e 0,07 g/l.h, respectivamente.

Assim como nas fermentações anteriores, observou-se consumo de ácido acético e aumento do valor de pH (de 5,5 para 6,5). Entretanto, apesar da levedura ter assimilado 100% dos açúcares fermentescíveis, verificou-se que os resultados do fator de rendimento

e da produtividade volumétrica foram significativamente menores, em relação aos máximos valores obtido nos ensaios do planejamento de experimento anterior. A menor concentração de etanol obtida neste experimento foi possivelmente pela verificação de significativa concentração de xilitol (cerca de 10 g/l) em 48 h no meio fermentativo. De fato, processos com alta concentração de células no interior das esferas de alginato de cálcio promovem alta competitividade entre os microrganismos por nutrientes e oxigênio, resultando em dificuldades de acesso entre as mesmas. Por exemplo, Dias et al. (2001) reportaram distribuição heterogênea de biomassa concentrada no interior de esferas contendo células imobilizadas, com aumento progressivo da densidade celular a partir do interior para o exterior da matriz. As condições de disponibilidade e de transferência de oxigênio e massa no interior da matriz de alginato de cálcio sugerem a mudança de metabolismo e formação de xilitol em ensaios com uma elevada concentração de células no interior grânulos. A possibilidade de acúmulo de xilitol no interior das células e a sua excreção para o meio está de fato associada à disponibilidade de oxigênio, considerando principalmente a dependência da enzima xilitol desidrogenase por NAD⁺. A recuperação deste cofator se limitada durante o metabolismo de xilose sob condições insuficientes de disponibilidade de oxigênio, resultam em um desequilíbrio redox e, e consequentemente, o acúmulo e excreção de xilitol pela células (JEFFRIES, 1983; GIRIO et al., 2010; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998).

Observou-se ainda comportamento semelhante aos ensaios anteriores quanto crescimento celular em forma livre e imobilizada. Verificou-se a formação de biomassa livre a partir de 12 horas de fermentação, obtendo-se cerca de 5,9 g/l em 96 h de fermentação (Figura 30). Já para concentração de células imobilizadas por volume de meio fermentativo, observou-se um aumento de 2 g/l para 3,4 g/l, após 96 h de fermentação.

Considerando-se o não desvio de metabolismo nos ensaios anteriores com menor concentração de células na solução de alginato de sódio, definiu-se o uso de 3 g/l de concentração celular em solução de alginato de sódio, para ser utilizado em todas as fermentações que prosseguem neste trabalho.

5.4.2 Avaliação do desempenho do sistema em bateladas repetidas em frascos Erlenmeyer

Avaliou-se o desempenho do sistema em estudo em bateladas repetidas e conduzidas inicialmente em frascos Erlenmeyer utilizando as células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizadas em alginato de sódio. A cada 72 h as esferas foram assepticamente lavadas e adicionadas a um novo substrato contendo hidrolisado hemicelulósico suplementado. Os resultados de $Y_{P/S}$ e Q_P de cada batelada são apresentados na Figura 32.

Figura 32. Valores de fator de rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) para ensaios fermentativos em bateladas repetidas em frascos Erlenmeyer utilizando a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio, para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar. Os resultados são médias de duplicatas, sendo que o desvio padrão se encontrou abaixo de 5%.

Fonte: Arquivo pessoal

Verificou-se estabilidade entre as três primeiras bateladas (0 h- 216 h), com valores de $Y_{P/S}$ próximos de 0,32 g/g e Q_P de 0,18 g/l.h. Apenas na quarta batelada (288 a 360 h), observou-se decréscimo significativo nestes parâmetros fermentativos ($Y_{P/S}$ de cerca de 0,20 g/g e Q_P de 0,11 g/l.h), entretanto na quinta batelada (360 a 432 h) o sistema novamente apresentou $Y_{P/S}$ de cerca de 0,30 g/g e Q_P de 0,18 g/l.h. Observou-se a estabilidade do sistema, uma vez que o resultados obtidos em bateladas repetidas foram semelhantes àqueles conduzidos em bateladas simples nas mesmas condições de

imobilização (Experimento 3 – Tabela 12). Resultados semelhantes também foram observados por Milessi (2012), que trabalhando com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e técnica de imobilização deste trabalho, porém utilizando células de *S. stiptis*, observou três bateladas repetidas estáveis com valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,21; 0,30 e 0,29 g/g e 0,13, 0,18 e 0,20 g/l.h, respectivamente. Behera et al. (2010) também observaram que células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio para a produção de etanol se mantiveram fisiologicamente ativas por três bateladas consecutivas, com uma diminuição de cerca 10% sobre o rendimento em etanol. Em outro estudo semelhante, Singh et al. (2013) relataram o uso efetivo de quatro ciclos para a produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio, apresentando valores de $Y_{P/S}$ de 0,42; 0,39; 0,37 e 0,33 g/g e Q_P de 0,33; 0,31; 0,29 e 0,27 g/l.h para cada batelada, respectivamente. Concomitantemente, Behera, Mohanty e Ray (2012) reportaram que células de *Zymomonas mobilis* MTCC 92 imobilizadas em alginato de cálcio para a produção de etanol a partir de melaço de cana-de-açúcar se mostraram fisiologicamente ativas por mais três ciclos de operação, com menos do que 15% de redução no fator de rendimento de etanol no quarto ciclo de operação. Nesta presente investigação todos os ensaios foram conduzidas até 72 h com a troca de substrato, entretanto os parâmetros fermentativos nas cinco primeiras bateladas foram calculados em 48 h de fermentação, considerando que este foi o tempo o qual se observou um consumo de açúcares superiores a 90% e maior concentração de etanol em todos experimentos, conforme apresentado na Figura 37. Verificou-se também em todos os experimentos o desprendimento da biomassa do interior das esferas, ocasionando aumento da concentração de células livres no meio, comportamento também observado nos trabalhos de Santos, (2005), Sarrouh, (2009) e Milessi, (2012). Ressalta-se que as esferas foram lavadas assepticamente entre cada troca de substrato e que somente as células imobilizadas foram transferidas para a nova batelada. Verificou-se também o aumento da concentração de células imobilizadas por volume de meio fermentativo, observando 0,9 g/l e 1,44 g/l, em 0 h e 576 h de fermentação, respectivamente. Este comportamento evidenciou a potencialidade e reciclo das células imobilizadas quanto a adaptação ao novo meio.

O perfil das fermentações, quanto as variáveis concentração de açúcares, etanol e biomassa livre em função do tempo total de fermentação, pode ser observado na Figura 33.

Figura 33. Perfil de consumo de açúcares, produção de etanol e biomassa livre em ensaios fermentativos conduzidos em bateladas repetidas em frascos Erlenmeyer utilizando a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio, para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Arquivo pessoal

Observou-se consumo de ácido acético e elevação de valores de pH (de 5,5 para cerca de 6,5) no final de cada fermentação em modo de bateladas repetidas, fato este já verificado em todos experimentos anteriores realizados neste trabalho.

De acordo com a Figura 33, observou-se um consumo de xilose próximo de 100% em 72 h de fermentação entre a primeira e a quinta batelada (até 432 h). Entretanto, conduziu-se as fermentações por mais duas bateladas e a partir do sexto reciclo (432 h), verificando-se a não assimilação da xilose pela levedura em sua totalidade, com cerca de 70% e 66% de consumo em 72 horas de fermentação para a sexta e sétima batelada, respectivamente. Observou-se também decréscimos significativos na produção de etanol e biomassa livre no meio. Este comportamento pode ser explicado em função do *stress* celular após 432 horas de fermentação, bem como sucessivas adaptações a um novo meio. Desta forma, é possível que a célula tenha perdido sua total potencialidade de conversão de xilose a etanol. Observou-se também que na sexta (432 a 504 h) e sétima batelada (504 a 576 h) a presença de pequenas concentrações de xilitol. Este fato sugere que quando as células se encontram em níveis de *stress* celular, essas tem dificuldade de recuperar o cofator NAD⁺ corretamente, tendo então direcionado o metabolismo para o acúmulo e excreção deste poliol. (JEFFRIES, 1983; GÍRIO et al., 2010; HAHN-HAGERDAL et al., 1994; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998). Ressalta-se que este efeito de acúmulo de xilitol também foi observado em outra situação de exposição das células ao *stress*, quando empregou-se alta concentração celular no interior dos *pellets* de alginato de cálcio (item 5.4.1.1), com elevada disputa por nutrientes e oxigênio. Segundo Carvalho et al. (2003), é possível que haja condições de limitação de oxigênio em determinadas regiões de sistemas imobilizados a partir de matriz de alginato de cálcio, devido à possível formação de zonas não aeradas no interior das mesmas.

5.5 DEFINIÇÃO DE CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO EM REATOR DE LEITO FLUIDIZADO

5.5.1 Velocidade mínima de fluidização e parâmetros operacionais para uso de células imobilizada de *S.shehatae* UFMG-HM 52.2 em matriz de alginato de cálcio em reator de leito fluidizado.

A velocidade mínima de fluidização (U_{mf}), uma variável importante quando se trabalha com reatores de leito fluidizado, foi determinada conforme item 4.6.1. Todos os

ensaios foram realizados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado, utilizando massas de 100, 150 e 200g de suporte com células imobilizadas, correspondentes aos limites inferior, ponto central e superior dos valores utilizados nos planejamentos estatísticos, conforme apresentado no item 4.6.3. Os testes foram realizados na região geométrica cilíndrica do reator (altura de 30 cm e seção transversal de 23,75 cm²) e com o sistema desaerado, uma vez que mínimas aerações influem a fluidização do leito neste sistema. Para o cálculo da porosidade do leito (ϵ), utilizou-se a densidade de 1 g/ml para as esferas de alginato de cálcio contendo células imobilizadas (SARROUH, 2009).

A tabela 14 apresenta para os três valores de massa de suporte utilizados, os dados de altura de leito de esferas contendo células imobilizadas em função da vazão de alimentação do sistema, bem como a condução dos cálculos, para obtenção da velocidade mínima de fluidização (U_{mf}). Verificou-se, considerando a média dos três resultados, que a velocidade mínima de fluidização (U_{mf}) no presente reator para o sistema com células imobilizadas em alginato de cálcio em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado foi de 0,16 cm/s. Observou-se que a massa de suporte escolhido, dentro dos níveis estudados (100-200g), não influenciou a velocidade mínima de fluidização, havendo proporcionalidade de aumento de massa e expansão do leito em função da velocidade do fluído. Em outro trabalho, Santos (2005), também verificou a velocidade mínima de fluidização neste tipo de reator, entretanto para diferentes suportes de imobilização. Apesar do autor imobilizar células em zeólita e vidro poroso, o mesmo verificou U_{mf} próxima ao do presente trabalho, observando 2,3 cm/s para ambos suportes.

Ressalta-se que para a condução das fermentações em reator de leito fluidizado neste trabalho, determinou-se a vazão de recirculação do fluído a partir de observações experimentais. Utilizou-se a vazão de 50,83 ml/s (2,14 cm/s), valor o qual obteve-se fluidização por completo no leito cilíndrico e parte superior do reator, sem a necessidade de aeração, em experimento utilizando 200 g de massa de suporte com células imobilizadas. Observa-se que esta velocidade é aproximadamente 14 vezes maior que a velocidade mínima de fluidização, uma vez que propõe-se utilizar toda extensão do reator (parte cilíndrica e superior), além de garantir homogeneidade do meio. Antes da condução das fermentações, esta velocidade foi previamente testada em todas condições do planejamento de experimentos, quanto a variação de massa de suporte e aeração.

Tabela 14 - Valores de vazão, velocidade, altura de leito, ε , $\ln(\varepsilon)$, $\ln(U_{tc})$, linearização, U_{tc} e U_{mf} , para carregamento do reator com 100, 150 e 200 g de suporte com células imobilizadas.

100 g de suporte com células imobilizadas								
Vazão (ml/s)	Velocidade (U _{tc}) (cm/s)	Altura (cm)	ε	ln (ε)	ln (U _{tc})	Linearização	U _{tc} = e ^{2,046} (cm/s)	*U _{mf} = 7,739 x ε ^{5,316} (cm/s)
0	0	8	0,474	-	-	ln U = n . ln ε + ln U _{tc}	7,739	0,146
6,70	0,28	9,3	0,547	-0,603	-1,265			
8,93	0,37	10,2	0,587	-0,532	-0,978			
38,23	1,61	13,8	0,695	-0,364	0,476	Y=5,316. X + 2,046	7,739	*
44,09	1,85	15,3	0,725	-0,322	0,619			
44,88	1,89	17,8	0,763	-0,270	0,637	R ² =0,926		ε para leito em repouso = 0,474
50,83	2,14	20,8	0,798	-0,226	0,761			
59,94	2,52	29,2	0,856	-0,156	0,926			
150 g de suporte com células imobilizadas								
Vazão (ml/s)	Velocidade (U) (cm/s)	Altura (cm)	ε	ln (ε)	ln (U _{tc})	Linearização	U _{tc} = e ^{2,012} (cm/s)	*U _{mf} = 7,481 . ε ^{5,463} (cm/s)
0,00	0,00	12,6	0,499	-	-	ln U = n . ln ε + ln U _{tc}	7,481	0,167
6,70	0,28	14,0	0,549	-0,600	-1,265			
8,92	0,37	15,5	0,592	-0,523	-0,978			
31,75	1,33	20,4	0,690	-0,371	0,291	Y=5,463. X + 2,012	7,481	*
38,23	1,61	27,5	0,770	-0,261	0,476			
44,08	1,85	29,2	0,784	-0,244	0,619	R ² = 0,959		ε para leito em repouso = 0,498
200 g de suporte com células imobilizadas								
Vazão (ml/s)	Velocidade (U) (cm/s)	Altura (cm)	ε	ln (ε)	ln (U _{tc})	Linearização	U _{tc} = e ^{2,818} (cm/s)	*U _{mf} = 16,75 . ε ^{6,518} (cm/s)
0,00	0,00	16,6	0,493	-	-	ln U = n . ln ε + ln U _{tc}	16,75	0,166
6,70	0,28	17,6	0,522	-0,651	-1,266			
8,92	0,37	19,2	0,562	-0,577	-0,979			
10,04	0,42	21,5	0,608	-0,497	-0,861	Y=6,518. X + 2,818	16,75	*
31,75	1,33	23,9	0,648	-0,434	0,290			
38,23	1,60	27,9	0,698	-0,359	0,476	R ² = 0,911		ε para leito em repouso = 0,493
44,08	1,85	29,2	0,712	-0,340	0,618			

Fonte: Arquivo pessoal

Sabe-se que para a operação do reator em modo leito fluidizado, faz-se necessário o equilíbrio entre as forças de arraste e o peso aparente das partículas. Este fenômeno, entretanto, é função de vários fatores como a porosidade das partículas, relação entre o diâmetro do suporte e da coluna, relação da massa específica entre o fluido e partícula, massa total de sólidos e as características do escoamento. Estas características proporcionam a este reator obter alta homogeneidade do meio reacional em toda sua extensão, com elevadas taxas de transferência de massa e calor entre o leito e as superfícies internas. Devido a alta homogeneidade do sistema, existe um comportamento caótico quanto a hidrodinâmica da dispersão das partículas (Al-RUBEAI; ALIWI, 2010). Segundo a literatura, alguns pesquisadores estudam este grau de caos pela entropia *Kolmogorov*, que é uma medida da taxa de perda de informação do sistema (expressa em bits de informação por segundo). Os sistemas caóticos são governados pela interação não-linear entre as variáveis do sistema e devido a esta não linearidade, estes sistemas são sensíveis a pequenas alterações das condições iniciais e são caracterizados por um número altamente limitado de previsibilidade (SCHOUTEN; VANDER STAPPEN; VAN DEN BLEEK, 1996). Em geral, para o cálculo deste caos deve-se analisar individualmente diferentes variáveis do sistema em definidos intervalos de tempo, de modo que esta entropia torna-se de difícil previsibilidade (BLEEK; SCHOUT, 1993). Por exemplo, Puettmann, Hartge e Werther (2012) desenvolveram um módulo de simulação para um reator de leito fluidizado borbulhante, por meio da adequação de variáveis por meio de um sistema de fluxogramas. Neste trabalho, é utilizado uma abordagem de equilíbrio da população de sólidos em estado estacionário para a determinação da distribuição das partículas no interior do reator. De fato, modelos para previsibilidade do completo comportamento hidrodinâmico de um reator de leito fluidizado apresentam um número restrito de informações (BLEEK; SCHOUT, 1993), devido a alta complexidade e dificuldade de controle das variáveis. Estudos hidrodinâmicos são abordados baseando-se principalmente em relações entre variáveis mais facilmente controláveis, a partir de regras de dimensionamento que são derivadas de balanço de massa e momento, resultante em uma hidrodinâmica adimensional, onde deve-se ser levado em conta principalmente parâmetros como Número de Reynolds (Re), Número de Froude (Fr), relação densidade da partícula/densidade do fluido, entre outros (GLICKSMAN, 1984). Para um dimensionamento adequado, estes números devem ser mantidos constantes, em conjunto com relações geométricas do reator,

além da mecânica adicional, como o coeficiente de restituição (CR), (razão de velocidades antes e após impacto) (SCHOUTEN, VANDER STAPPEN; VAN DEN BLEEK, 1996). Outra estratégia para o estudo hidrodinâmico em reatores de leito fluidizado é a partir de dados experimentais do leito do reator, conforme utilizado neste trabalho, ou a partir de modelos experimentais pré-determinados, visando a resposta do sistema (KUNII; LEVENSPIEL, 1969; BLEEK; SCHOUTEN, 1993).

5.5.2 Avaliação da influência das variáveis vazão de alimentação de ar e massa de suporte com células imobilizadas para a produção de etanol de segunda geração em reator de leito fluidizado utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 pelo método de aprisionamento em gel

Realizou-se um planejamento estatístico (fatorial completo do tipo 2^2 com três ensaios no ponto central) para investigação de parâmetros diretamente relacionados aos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P , como vazão de alimentação de ar e massa de suporte com células imobilizadas, no processo de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 pelo método de aprisionamento em gel. Os níveis superiores e inferiores escolhidos para estas variáveis (vazão de alimentação de ar: 50 - 200 ml/min e massa de suporte imobilizado: 100 - 200g) foram determinados de acordo com testes operacionais baseados na configuração, geometria e comportamento das esferas no leito do reator.

5.5.2.1 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

A massa de suporte com células imobilizadas, bem como a aeração são variáveis fundamentais em bioprocessos (RODMUI; KONGKIATTIKAJORN; DANDUSITAPUN, 2008, SARROUH, 2008; SANTOS, 2005), uma vez que pequenas variações no suprimento e distribuição de oxigênio podem influenciar os diretamente parâmetros em biorreatores, como por exemplo, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}). Neste contexto, antes da execução das fermentações, verificou-se o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) em todas condições pertinentes ao planejamento de experimentos, conforme apresentado na Tabela 15.

Tabela 15 - Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) para diferentes condições de vazão de aeração e massa de suporte com células imobilizadas, para produção de etanol por células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 em reator de leito fluidizado.

Experimento	Vazão de aeração		Massa de suporte com células imobilizadas (g)	K_{La} (h^{-1})
	(ml/min)	vvm (min^{-1})		
1	50	0,027	100	2,20
2	200	0,111	100	5,44
3	50	0,027	200	2,20
4	200	0,111	200	4,22
5	125	0,069	150	4,32
6	125	0,069	150	3,96
7	125	0,069	150	3,96

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a tabela 15, observou-se que os experimentos com maior aeração (Exp. 2 e 4) apresentaram maior valor de K_{La} (Exp. 2: $5,44 h^{-1}$; Exp. 4: $4,22 h^{-1}$) em relação aos de menor aeração (Exp. 1: $2,20 h^{-1}$; Exp. 3: $2,20 h^{-1}$), uma vez que maiores vazões de ar proporcionaram maior área de contato entre o ar e o fluído, resultando em aumento do coeficiente de transferência de massa da fase líquida (K_L) e maior maior transferência de oxigênio no meio (SCHMIDELL, 2001). Resultados semelhantes foram observados por Sarrouh (2009), o qual o autor verificou que o aumento da aeração proporcionou aumento no valor de K_{La} , em experimentos utilizando *Candida guilliermondii* imobilizadas em alginato de cálcio em reator de leito fluidizado para a produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Neste trabalho, aumentando-se a vazão de aeração de 200 ml/min para 1000 ml/min, obteve-se elevação de K_{La} de $6 h^{-1}$ para $23 h^{-1}$, respectivamente (reator operado em 57 L/h e concentração de hidrolisado de 7 vezes). Em outro trabalho, MOLWITZ et al. (1996), também relataram a relação entre a vazão de aeração e o valor de K_{La} , onde os autores verificaram redução de K_{La} aproximadamente 10 vezes (de $K_{La} = 43 h^{-1}$ para $K_{La} = 4 h^{-1}$), quando reduziu-se a

aeração de 0,5 vvm para 0,05 vvm, respectivamente, em trabalho de produção de xilitol a partir de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

No trabalho de Sarrouh (2009), trabalhando com células imobilizadas neste mesmo tipo de reator deste trabalho, observou-se que o aumento da vazão de alimentação do fluído também elevou o valor de K_{La} . Neste trabalho, utilizando a vazão de alimentação de fluído de 19 L/h e 57 L/h, verificou-se valores de K_{La} de 5 h^{-1} e 6 h^{-1} , respectivamente (reator operado em 200 ml/min e concentração de hidrolisado de 7 vezes). Ressalta-se que no presente trabalho em reator de leito fluidizado operado com células imobilizadas com *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, não variou-se a vazão de recirculação, sendo que a diferença obtida de K_{La} entre os diferentes experimentos foi gerada pela vazão de ar e sua interação com o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, bem como com a massa de suporte utilizado.

5.5.2.2 Avaliação dos ensaios fermentativos em função das diferentes condições experimentais estudadas

A determinação dos efeitos das variáveis vazão de alimentação de ar e massa de suporte com células imobilizadas na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 pelo método de aprisionamento em gel foi realizada por meio de um planejamento fatorial completo do tipo 2^2 com três ensaios no ponto central, sendo consideradas variáveis resposta a eficiência de conversão de etanol ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica de etanol (Q_P). A tabela 16 apresenta os valores codificados e reais das variáveis estudadas, bem como os resultados das variáveis resposta para cada ensaio.

Tabela 16 - Níveis codificados e valores reais das variáveis independentes estudadas (A) vazão de aeração e (B) massa de suporte com células imobilizadas; e resultados das variáveis resposta fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) para cada ensaio do planejamento estatístico 2^2 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de produção de etanol em reator de leito fluidizado utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.

Experimento	Valores codificados		Valores reais			
	(A)	(B)	(A)	(B)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/l.h)
			Vazão de aeração (ml/min)	Massa de suporte com células imobilizadas (g)		
1	-1	-1	50	100	0,276	0,125
2	1	-1	200	100	0,219	0,130
3	-1	1	50	200	0,288	0,132
4	1	1	200	200	0,265	0,177
5	0	0	125	150	0,281	0,140
6	0	0	125	150	0,277	0,138
7	0	0	125	150	0,276	0,137

Fonte: Arquivo pessoal

Observou-se neste planejamento de experimentos variações no $Y_{P/S}$ de 0,069 g/g, sendo o valor mínimo de cerca 0,22 g/g encontrado no experimento 2 (vazão de aeração de 200 ml/min e 100g de massa de suporte, K_{La} : 5,4 h⁻¹) e o maior valor, de 0,288 g/g, encontrado no experimento 3 (vazão de aeração de 50 ml/min e 200 g de massa de suporte, K_{La} : 2,2 h⁻¹). Para a variável resposta Q_P , encontrou-se variação de 0,052 g/l.h, onde o valor mínimo de 0,125 g/l.h foi encontrado no experimento 1 (vazão de aeração de 50 ml/min e 100 g de massa de suporte, K_{La} : 2,2 h⁻¹), enquanto o maior valor, de 0,177 g/l.h, foi observado no experimento 4 (vazão de aeração de 200 ml/min e 200 g de massa de suporte K_{La} : 4,22 h⁻¹). Observou-se também, consumo de açúcares superiores a 90% em todos os experimentos, sendo obtidos em tempos de 36 a 48 h de fermentação. Apenas para os experimentos 2 e 4, valores superiores a 90% de consumo de açúcar e maior concentração de etanol foram obtidos em 36 horas, sendo que em todos demais condições este comportamento foi observado em 48 horas de fermentação. O perfil fermentativo de

consumo de açúcares e produção de etanol de todos os experimentos referentes a execução do planejamento estatístico pode ser observado na Figura 34.

Figura 34 - Perfil de consumo de açúcares e produção de etanol em função do tempo pela levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado, conduzidas em diferentes condições (de acordo com a Tabela 16).

Fonte: Arquivo pessoal

Verificou-se também, a presença de concentrações de xilitol em todos experimentos, assim como já observado em outros experimentos utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2. Observou-se, menores concentrações de xilitol nos experimentos conduzidos com maior massa de suporte com células imobilizadas, nos ensaios 3 (cerca de 1,2 g/l) e 4 (cerca de 0,7 g/l). Nos experimentos conduzidos com menor massa, observou-se maior produção de xilitol, nos experimentos 1 (cerca de 7,3 g/l) e 2 (cerca de 5,2 g/l). Quanto aos experimentos dos pontos centrais, observou-se média de concentrações de cerca de 6,9 g/l de xilitol. Por este comportamento, foi possível verificar que a massa celular a ser utilizada no reator perante a disponibilidade de oxigênio fornecido exerceu influência no metabolismo da levedura imobilizada *S. shehatae* UFMG 52.2. Por este fato, ressalta-se a importância de entender e estabelecer

condições no reator que maximizem o direcionamento do metabolismo da levedura em sua forma imobilizada à produção de etanol.

Os resultados deste planejamento de experimentos foram analisados estatisticamente quanto aos valores obtidos das variáveis resposta. A figura 35 apresenta o diagrama de Pareto, e a Tabela 17 apresenta a análise de variância (ANOVA), referentes aos resultados estatísticos das variáveis vazão de aeração e massa de suporte com células imobilizadas, bem como suas interações, para as variáveis respostas $Y_{P/S}$ e Q_P .

Figura 35 - Gráfico de pareto com as variáveis dependentes fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes (A) vazão de aeração e (B) massa de suporte com células imobilizadas, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^2 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de produção de etanol em reator de leito fluidizado a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 17 - Análise de variância para as variáveis dependentes fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes (A) vazão de aeração e (B) massa de suporte com células imobilizadas, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^2 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de produção de etanol em reator de leito fluidizado a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.

$Y_{P/S}$					
Variável	SS	df	MS	F	p
(A) Aeração	$1,58. 10^{-03}$	1	$1,58. 10^{-03}$	$1,07. 10^{+01}$	$4,67. 10^{-02*}$
(B) Massa	$8,56. 10^{-04}$	1	$8,56. 10^{-04}$	$5,78. 10^{+00}$	$9,55. 10^{-02}$
(A) x (B)	$2,81. 10^{-04}$	1	$2,81. 10^{-04}$	$1,90. 10^{+00}$	$2,62. 10^{-01}$
Erro	$4,44. 10^{-04}$	3	$1,48. 10^{-04}$		
Total SS	$3,16. 10^{-03}$	6			
R-sqr =0,859					
Q_P					
Variável	SS	df	MS	F	p
(A) Aeração	$6,08. 10^{-04}$	1	$6,08. 10^{-04}$	$1,11. 10^{+02}$	$1,84. 10^{-03*}$
(B) Massa	$6,98. 10^{-04}$	1	$6,96. 10^{-04}$	$1,27. 10^{+02}$	$1,50. 10^{-03*}$
(A) x (B)	$3,93. 10^{-04}$	1	$3,93. 10^{-04}$	$7,15. 10^{+01}$	$3,47. 10^{-03*}$
Erro	$1,60. 10^{-05}$	3	$5,00. 10^{-06}$		
Total SS	$1,72. 10^{-03}$	6			
R-sqr =0,990					

* Fatores significativos

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a análise estatística, observou-se que em um nível de 95% de confiança, apenas a variável vazão de aeração foi significativa ($p < 0,05$) para a variável resposta $Y_{P/S}$. O modelo de primeira ordem ($R^2 : 0,86$), incluindo as variáveis independentes e interações, é apresentado na Equação 22.

$$Y_{P/S} = 0,300510 - 0,000601 (A) + 0,000013 (B) + 0,000002 (AB) \quad (22)$$

Entretanto, também para um modelo linear de primeira ordem ($R^2:0,99$, apresentado na Equação 23, para a variável resposta Q_P , ambas variáveis independentes, bem como sua interação, se mostraram estatisticamente significativas.

$$Q_P = 0,129803 - 0,000232 (A) - 0,000066 (B) + 0,000003 (AB) \quad (23)$$

De acordo com os resultados obtidos, para a variável vazão de aeração, observou-se efeito negativo para $Y_{P/S}$ e efeito positivo para Q_P . Para a variável massa de suporte com

células imobilizadas, verificou-se efeito significativo positivo para Q_P . Para esta variável resposta, mesmo não tendo apresentado significância a 95% de confiança para $Y_{P/S}$, ressalta-se que a mesma apresentou efeito positivo. Considerando este perfil de resultados, analisou-se a superfície de resposta da interação de ambas variáveis dependentes, conforme apresentado nas Figuras 36 e 37.

Figura 36 - Gráfico de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para a variável dependente fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$), de acordo com resultados das variáveis independentes vazão de aeração e massa de suporte com células imobilizadas, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^2 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de produção de etanol em reator de leito fluidizado a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 37 - Gráfico de superfície de resposta (A) e de contorno (B) para a variável dependente produtividade volumétrica (Q_P), de acordo com resultados das variáveis independentes vazão de aeração e massa de suporte com células imobilizadas, referentes aos resultados do planejamento estatístico 2^2 completo com três pontos centrais, para estudo de condições de produção de etanol em reator de leito fluidizado a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Figura 36, observa-se pelos gráficos de superfície de resposta e contorno de área que o aumento da massa de suporte com células imobilizadas e a redução da vazão de aeração elevam o valor de $Y_{P/S}$. Para a variável Q_P (Figura 36), verifica-se sua maximização quando eleva-se o valor da massa de suporte e aeração. Neste contexto, pela análise estatística, fica-se evidente o uso de 200 g de massa de suporte. Para a variável vazão de aeração, observou-se efeitos distintos, sendo negativo para $Y_{P/S}$ e positivo para Q_P . Entretanto, observou-se pelo gráfico de superfície de resposta e contorno, que ao utilizar-se vazão de aeração em nível alto junto a massa de suporte também em nível alto, que os valores de $Y_{P/S}$ são sensivelmente menores (cerca de 0,01 g/g) a quando emprega-se vazão de aeração em nível baixo, junto a massa de suporte em nível alto. Desta maneira, considerando-se o efeito positivo da vazão de aeração para Q_P , verificou-se que a melhor condição para este processo, dentro dos níveis estudados, é utilizando vazão de aeração em nível alto (200 ml/min), junto a massa de suporte em nível alto (200 g). Neste presente trabalho, os valores inferiores e superiores, escolhidos para ambas variáveis, foram determinados em condições experimentais preliminares realizadas no reator de leito fluidizado.

Considerando as variáveis independentes massa de suporte com células imobilizadas e aeração, ressalta-se a importância da correta seleção de valores para cada bioprocessos em biorreatores, uma vez que as mesmas e sua interação costumam influenciar diretamente a concentração do bioproduto. Por exemplo, Santos (2005) apresentou uma investigação sobre a influência da taxa de aeração ($0,031$ - $0,093 \text{ min}^{-1}$) e concentração de suporte com células imobilizadas (62,5 -125 g/l) na produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado utilizando células de *C. guilliermondii* imobilizadas em vidro poroso. Neste estudo, o autor verificou que a concentração de suporte teve influência negativa sobre $Y_{P/S}$ e Q_P , enquanto a aeração teve influência positiva sobre Q_P e negativa sobre $Y_{P/S}$. Nas condições de aeração de $0,0031 \text{ min}^{-1}$ e concentração de suporte imobilizado de 62,5 g/l o autor observou $Y_{P/S}$ de 0,38 g/g e Q_P de 0,18 g/l.h. Santos (2005), em processo semelhante ao empregado no presente trabalho, entretanto estudando a produção de xilitol com células de *C. guilliermondii* imobilizadas em zeólitas, também verificou que maiores vazões de ar favoreceram Q_P , entretanto com redução em $Y_{P/S}$. Em outro trabalho, Sarrouh, Santos e Silva (2007) trabalharam com 300g de suporte com células imobilizadas e 600 ml/min de

vazão de aeração no processo de produção de xilitol em reator de leito fluidizado a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizando células imobilizadas de *C. guilliermondii*, observando $Y_{P/S}$ de 0,58 g/g e Q_P de 0,4 g/l.h, após 70h de fermentação.

Assim como neste presente trabalho, observa-se em outros estudos a potencialidade do uso de células imobilizadas em outros biorreatores. Por exemplo, Milesi (2012) avaliou a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de mistura tipo cesta, utilizando células de *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 imobilizada em matriz de alginato de cálcio. Neste trabalho, a autora verificou-se valores de $Y_{P/S}$ de 0,21g/g e Q_P de 0,15 g/l.h.

Assim como nos demais experimentos conduzidos por células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, em todos os ensaios deste trabalho (Tabela 16), a partir de 12 h de fermentação, verificou-se a liberação e reprodução de células livres no meio fermentativo, a partir das esferas de alginato de cálcio, apresentado na Figura 38.

Figura 38 - Perfil da produção de biomassa em forma livre, a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura imobilizada *S. shehatae* UFMG-HM 52.2, conduzida em diferentes condições em reator de leito fluidizado (de acordo com a Tabela 16).

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Figura 38, observa-se que os experimentos conduzidos com vazão de aeração em nível baixo apresentaram menores valores de concentração de células livres

em 72 h de fermentação, sendo cerca de 4,9 g/l para o experimento 1 e 2,8 g/l para o experimento 3. Concomitantemente a este fato, observa-se maiores valores de células livres para os experimentos de pontos centrais, apresentando média de cerca de 4,4 g/l, e com os experimentos conduzidos em nível alto de aeração, verificando-se 7,4 g/l para o experimento 2 e 5,8 g/l para o experimento 4. Observa-se que, o maior fornecimento de oxigênio proporcionou ao metabolismo da levedura maior reprodução celular. Ressalta-se a importância do ajuste da variável aeração na produção de etanol por leveduras. Por exemplo, Rodmui, Kongkiattikajor e Dandusitapun, (2008) relataram que o valor correto de aeração está entre os principais parâmetros a serem estudados para a assimilação de xilose por leveduras, uma vez que seus níveis podem influenciar e direcionar o metabolismo celular.

A concentração de células imobilizadas por volume de reator também foi verificada no tempo inicial e final de todos os experimentos, apresentada na Figura 39.

Figura 39 - Concentração de biomassa imobilizada por volume de reator em 0 e 96 horas de fermentação, em ensaios fermentativos utilizando a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio, para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado, conduzidas em diferentes condições (de acordo com a Tabela 16).

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Figura 39, verificou-se o crescimento de biomassa no interior das esferas em todos os experimentos, assim como já observado em outros ensaios utilizando células imobilizadas de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2. Verificou-se maiores valores de

concentração celular por volume de reator em 96h nos experimentos 3 e 4 (Exp. 3 - 1,8 e Exp. 4 - 1,9 g/l por volume de reator), em função de terem sido conduzidos com maior massa de suporte com células imobilizadas. Concomitantemente, observou menores valores para os experimentos 1 e 2 (Exp. 1 - 0,8 e Exp. 2 - 0,9 g/l por volume de reator), realizados com menor massa de suporte.

Neste planejamento de experimentos em reator de leito fluidizado, observou-se que o maior valor da variável resposta $Y_{P/S}$ (Exp. 3) correspondeu a cerca de 87% do maior valor obtido em fermentações em frascos Erlenmeyer. Entretanto, para a variável Q_P , o maior valor obtido entre os experimentos (Exp. 4) foi cerca de 18% maior ao valor máximo obtido no planejamento de experimentos anterior. Este comportamento ocorreu possivelmente pela condução dos ensaios, tanto em frasco, quanto em reator, em condições propícias de fermentação para a levedura imobilizada. Entre estas condições, destaca-se as características do hidrolisado hemicelulósico, bem como o meio nutricional, as condições de imobilização, temperatura, pH, aeração, entre outros fatores. De fato, os resultados em reator apresentaram valores próximos àqueles em frascos, evidenciando a potencialidade de aumento de escala da proposta de produção de etanol de segunda geração utilizando células imobilizadas. Ressalta-se ainda a importância do estudo das condições operacionais do reator, bem como sua condução em diferentes modos, como por exemplo, em bateladas repetidas, visando maximizar os parâmetros deste bioprocessos.

5.5.3 Avaliação do desempenho do sistema em bateladas repetidas em reator de leito fluidizado

Posteriormente a definição de parâmetros a serem empregados no reator de leito fluidizado (vazão de aeração de 200 ml/min e 200 g de suporte com células imobilizadas, K_{La} : 4,22 h⁻¹), por meio de planejamento estatístico de experimentos, avaliou-se o desempenho de bateladas repetidas com o sistema contendo as células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizada em alginato de sódio. O sistema imobilizado presente no leito do reator foi utilizado como inóculo para a batelada seguinte (ARIYAJAROENWONG et al., 2012). A cada 48 horas o reator era descarregado e conseqüentemente carregado com um novo substrato contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado e suplementado. Os valores de $Y_{P/S}$, bem como de Q_P destas bateladas são apresentados na Figura 40.

Figura 40. Valores de fator de rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) para ensaios fermentativos em bateladas repetidas em reator de leito fluidizado utilizando a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio, para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar.

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Figura 40, verifica-se que os resultados da primeira batelada apresentaram valores de $Y_{P/S}$ de 0,274 g/g e Q_P de 0,239 g/l.h. Este valores eram esperados segundo as condições empregadas de acordo com o planejamento estatístico de experimentos (Condição 4 -Tabela 16). Para o valor de $Y_{P/S}$, em relação a primeira batelada, observou-se valores superiores da segunda a sexta batelada (Bat. 2: 0,374 g/g; Bat. 3: 0,346 g/g; Bat. 4: 0,398 g/g; Bat. 5: 0,361 g/g; Bat. 6: 0,317 g/g), demonstrando que o sistema favoreceu o fator de rendimento de etanol. Este comportamento possivelmente ocorreu em função de maior adaptação das células ao meio, bem como ao aumento da carga inicial de células nas bateladas repetidas, uma vez que o reator não foi lavado entre a troca de batelada, e células livres permaneciam presentes nas paredes no mesmo. Ressalta-se que a quarta batelada (144 h -192 h) apresentou o maior valor de $Y_{P/S}$ entre todos os experimentos (0,398 g/g), sendo observado estabilidade entre a segunda e a sexta batelada, com flutuações de $Y_{P/S}$ de cerca de 0,081 g/g. Para valores de Q_P , verificou-se em cinco bateladas consequentes a primeira, valores superiores (Bat. 3: 0,363 g/l.h; Bat. 5: 0,246 g/l.h e Bat. 6: 0,34 g/l.h) e inferiores (Bat. 2: 0,209 g/l.h e Bat. 4: 0,217 g/l.h) ao ensaio

inicial. Entretanto, em todos estes experimentos, observou-se que os valores foram significativos para a execução das bateladas repetidas, em vista que o sistema apresentou Q_P acima do esperado (Figura 27), segundo a análise estatística, para as condições estabelecidas de vazão de aeração de 200 ml/min e 200 g de massa de suporte com células imobilizadas, demonstrando que o sistema de bateladas repetidas também favoreceu a produtividade volumétrica.

Ressalta-se que os valores de $Y_{P/S}$ e Q_P obtidos, nas bateladas repetidas em reator, estão próximos, e em algumas bateladas, foram superiores aos valores obtidos pelos experimentos utilizando apenas células livres de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 (Ítem 5.3) e células imobilizadas em bateladas simples (Ítem 5.4), demonstrando a potencialidade do sistema. Comportamento semelhante foi encontrado por Santos (2005), onde observou-se aumento da eficiência do processo em bateladas repetidas avaliando a produção de xilitol em sucessivas fermentações a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, porém utilizando células *C. guilliermondii* imobilizadas em vidro poroso em reator de leito fluidizado. Neste trabalho, o autor observou aumento de valores de cerca de 26% e 33%, para $Y_{P/S}$ e Q_P , respectivamente, comparando a quinta batelada em relação a segunda batelada. Em outro trabalho, Sarrouh e Silva (2013) também reportam a estabilidade do sistema de bateladas repetidas em reator de leito fluidizado, entretanto para a produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando células de *C. guilliermondii* imobilizada em matriz de alginato de cálcio. Nesta investigação, os autores conduziram 7 fermentações sucessivas, onde observaram estabilidade em 6 bateladas repetidas, com $Y_{P/S}$ e Q_P médio de 0,7 g/l e 0,42 g/l.h, respectivamente. Esses autores ainda relataram o decréscimo de concentração de xilitol apenas na sétima batelada, a partir de 504 h de fermentação. Ding (2011) também apresentou a viabilidade do processo de produção de etanol em bateladas repetidas em reator de leito fluidizado, entretanto a partir de hidrolisado hemicelulósico de espiga de milho utilizando células imobilizadas de *Cândida* sp. ZU04. Neste trabalho, o autor reportou que o sistema imobilizado foi reutilizado por 6 bateladas consecutivas, por 501 horas, apresentando $Y_{P/S}$ de 0,73 g/l e Q_P médio de 0,84 g/l.h.

Encontra-se também na literatura pertinente, trabalhos apresentando a estabilidade do uso de células imobilizadas em matriz de alginato de cálcio em outros biorreatores. Por exemplo, Milessi (2012) realizou cinco bateladas consecutivas, com o propósito de avaliar

a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar usando células imobilizadas de *S. stipitis*. Neste trabalho, a autora verificou estabilidade de produção de etanol nas três primeiras bateladas, sendo observado para as cinco bateladas consecutivas $Y_{P/S}$ de 0,22; 0,24; 0,20; 0,19 e 0,12 g/g e Q_P de 0,15 0,16 0,12 0,10 e 0,07 g/l.h, respectivamente. Resultados semelhantes também foram observados por Carvalho, Canilha e Silva (2008), onde os autores avaliaram a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em bateladas repetidas em reator de mistura utilizando células imobilizadas de *Candida guilliermondii* FTI 20037. Neste trabalho, os autores observaram valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,71 g/g e 0,43 g/l.h, respectivamente, durante cinco bateladas consecutivas.

Evidencia-se, que neste presente trabalho, o sistema imobilizado em reator de leito fluidizado apresentou alta estabilidade de produção de etanol, apresentando redução do fator de rendimento de processo apenas na sétima batelada (288h-336h), fato que sugere um *stress* celular ocasionado pelas altas horas de fermentação. Entre a primeira e a sétima batelada, observou-se consumo de mais de 90% de açúcares disponíveis e concentração máxima de etanol em todos experimentos dentro do tempo de fermentação de 48h . O perfil fermentativo de todas estas bateladas com o consumo de açúcares, e a produção de etanol e células livres, pode ser observado na Figura 41.

Ressalta-se que apesar da sétima batelada já ter apresentados resultados de $Y_{P/S}$ e Q_P inferiores às demais, conduziu-se o experimento por mais uma batelada (Batelada 8 - 384 a 432h) para verificação se aqueles valores tenderiam a contínua redução. Neste experimento verificou-se que a levedura não consumiu mais de 90% de açúcares em 48 horas, como nas demais bateladas, além de apresentar significativa redução na produção de etanol.

Figura 41 - Perfil de consumo de açúcares, produção de etanol e biomassa livre em ensaios fermentativos conduzidos em bateladas repetidas em reator de leito fluidizado utilizando a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizada em matriz de alginato de cálcio, para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Fonte: Arquivo pessoal

Como em todos demais experimentos utilizando a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 em alginato de cálcio, observou-se a produção de xilitol concomitantemente ao etanol. Entre a primeira e sexta batelada, observou-se cerca de 1 g/l de xilitol no meio

fermentativo, enquanto na sétima e oitava, esse valor foi de cerca de 2,6 g/l. Este comportamento da levedura de maior acúmulo de xilitol em experimentos de altos tempos de fermentação em reator é concomitante aos experimentos de bateladas repetidas conduzidos em frascos Ernleymeyers, conforme apresentado no item 5.4.2.

Em todas bateladas verificou-se crescimento de células livres (48 h de fermentação: Bat. 1 - 5,2 g/l; Bat. 2 - 4,8 g/l ; Bat. 3 - 4,8 g/l ; Bat. 4 - 3,9 g/l ; Bat. 5 - 3,2 g/l ; Bat. 6 3,3 g/l; Bat. 7 -2,1 g/l; Bat. 8. - 3,0 g/l). Ressalta-se que, diferentemente da primeira batelada, entre o segunda e o oitava reciclo, a carga inicial celular consistia da massa de células imobilizadas e de células livres presentes nas paredes do reator, uma vez que o experimento foi realizado apenas com troca de substrato, sem lavagem do mesmo. Observou-se que no início da segunda até a sétima batelada, as concentrações iniciais de células livres foram de 0,05g/l; 0,5 g/l; 1,12 g/l; 0,58 g/l; 0,8 g/l e 1,45 g/l, respectivamente. Dessa forma, o inóculo em bateladas repetidas foi maior do que na primeira batelada, em vista do crescimento interno de célula no interior dos pellets, somado as células livres remanescentes da batelada anterior nas superfícies do reator. Este fato sugere os maiores valores de $Y_{P/S}$ e Q_P encontrados em bateladas repetidas.

Assim como nos experimentos anteriores utilizando este sistema imobilizado, observou-se elevação da concentração de células imobilizadas por volume de reator, observando 0,41 g/l no início do processo e 1,51 g/l após 384 h de fermentação. Não observou-se também redução, nem desfragmentação de esferas, em todo tempo de fermentação.

A estabilidade do experimentos deste presente trabalho, aliado a fácil empregabilidade da técnica e da configuração do reator, bem como a promissora levedura, demonstram o uso em potencial de 336 horas de fermentação (14 dias), em 6 bateladas consecutivas de produção de etanol de segunda geração a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Esta estabilidade também foi comprovada pelos estudos de Perez-Bibbins et al. (2015), os quais os autores reportam a viabilidade e potencialidade do uso de células imobilizadas, principalmente em matriz de alginato de cálcio, em reatores de leito fluidizado, para bioprocessos conduzidos por períodos prolongados por meio de reutilização celular.

6. CONCLUSÕES

- Foi possível definir um meio nutricional para a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, visando à produção de etanol, utilizando a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2.
- As variáveis concentração de alginato de sódio, cloreto de cálcio e tempo de cura, bem como suas interações, no processo de imobilização celular, não foram significativas para a variável resposta $Y_{P/S}$.
- As variáveis concentração de cloreto de cálcio e as interações entre a concentração de alginato de sódio e tempo de cura, e a concentração de cloreto de cálcio e o tempo de cura, no processo de imobilização celular, foram fatores significativos para a variável resposta Q_P .
- Sob as melhores condições de imobilização celular, foi possível estabelecer condições de fermentação que favoreceram a produção de etanol, possivelmente pela estrutura física estável das esferas contendo células imobilizadas, bem como pelas condições de acessibilidade de nutrientes e crescimento celular no interior das mesmas, com a liberação de células para o meio fermentativo.
- Altas concentrações celulares no interior das esferas de alginato de cálcio reduziram os valores de $Y_{P/S}$ e Q_P , possivelmente por dificuldades de acessibilidade de nutrientes e oxigênio pelas células.
- Para a produção de etanol em reator de leito fluidizado, as variáveis vazão de aeração, massa de suporte com células imobilizadas e sua interação foram fatores significativos para a variável Q_P . Por outro lado, para $Y_{P/S}$, apenas a variável independente vazão de aeração foi um fator significativo. Dentro da faixa estudada, maiores valores de massa de suporte com células imobilizadas elevaram os valores de ambas variáveis respostas, indicando que maiores cargas celulares e faixas específicas de aeração favoreceram a produção de etanol.

- Foi possível estabelecer condições favoráveis à produção de etanol em fermentações conduzidas em bateladas simples utilizando células imobilizadas em reator de leito fluidizado, possivelmente pelas condições adequadas de fermentação para a levedura imobilizada e em forma livre.
- O processo de imobilização permitiu o uso das esferas de alginato de cálcio em fermentações operadas em modo de bateladas repetidas em frascos Erlenmeyer e em reator de leito fluidizado. Em ambos sistemas foi possível estabelecer condições favoráveis à produção de etanol, bem como à estabilidade do sistema. As esferas contendo células imobilizadas não apresentaram variação no diâmetro, nem desfragmentação, demonstrando a potencialidade dos sistemas propostos.
- Foi possível obter-se maiores valores de $Y_{P/S}$ e Q_P nas fermentações conduzidas em modo de bateladas repetidas em reator de leito fluidizado, possivelmente, pelos maiores valores de carga microbiana consequentes das fermentações conduzidas em ciclos consecutivos no reator de leito fluidizado.
- Os resultados apontam a potencialidade do sistema de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado, utilizando células de *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizadas em matriz de alginato de cálcio.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Obtenção de esferas com células imobilizadas em diferentes diâmetros, avaliando a sua influência na produção de etanol.
- Avaliação de diferentes vazões de recirculação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar na produção de etanol em bateladas simples e repetidas, utilizando células imobilizadas em reator de leito fluidizado.
- Avaliação da substituição parcial e gradativa de suporte com células imobilizadas após elevados tempos de fermentação conduzidas por bateladas repetidas.
- Avaliação da produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizando células imobilizadas em reator de leito fluidizado operado sob diferentes modos de condução.
- Avaliação da produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em bateladas repetidas, utilizando células imobilizadas em reator de leito fluidizado de maiores volumes.

8. REFERÊNCIAS

- ABDELMAJEED, N. A.; KHELIL, O. A.; DANIAL, E.N. Review: immobilization technology for enhancing bio-products industry. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p.13528-13539, 2012.
- AGBOR, V.B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology Advanced**, v.29,p. 675–685, 2011.
- AGUILAR, R.; RAMIREZ, J. A.;GARROTE, G.; VAZQUEZ, M.; Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse, **Journal of Food Engineering**, v.55, p. 309–318, 2002.
- AJIBOLA F.O.; EDEMA, M.O.; OYEWOLE ,O.B.; Enzymatic production of ethanol from cassava starch using two strains of *Saccharomyces cerevisiae*, **Nigerian Food Journal**, v. 30, n. 2, 2012.
- AKIN, C. Biocatalysis with immobilized cells. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 5, p. 319-367, 1987.
- ALEXANDER, M. A.; YANG, V. W.; JEFFRIES, T. W.; Levels of pentose phosphate pathway enzymes from *Candida shehatae* grown in continuous culture. **Applied microbiology and biotechnology**, v.29, p. 282-288, 1988.
- AL-RUBEAI, J.; ALIWI, N.M. A study of chaotic behavior of heat transfer in gas-solid fluidized bed, **Engineering. & Technology Journal**, v.28, n. 10, 2010.
- ALVES, L. A.; FELIPE M. G. A. ; SILVA, J. B. A. ; SILVA, S. S. ; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70, p.89-98, 1998.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v.101, p.4851-4861, 2010.
- ANANDA, N.; VADLANI, P.; MADL, R.L. Rice bran extract is an effective substitute for yeast extract in ethanol fermentation. **Journal of biobased materials and bioenergy**, v.5, n.1, p.70-74(5), 2011.

ANISH, R.; RAO, M. Bioethanol from lignocellulosic biomass Part III hydrolysis and fermentation. Handbook of Plant-Based Biofuels, p. 159-173, 2009.

ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; SANTOS, J. C.; ROSA, C. A.; DA SILVA, S. S. Bioethanol production from sugarcane bagasse by a novel brazilian pentose fermenting yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Evaluation of fermentation medium. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

ANUPAMAA, P.; RAVINDRAB, Value-added food: single cell protein, **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 459–479, 2000.

ARIYAJAROENWONG, P.; LAOPAIBOON, P.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, L. Repeated-batch ethanol production from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on sweet sorghum stalks, **Energies**, v.5, p.1215-1228, 2012.

AZAM, S.; KHAN, Z.; AHMAD, B.; KHAN, I.; ALI, J. Production of single cell protein from orange peels using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*, **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 9, n.1, p. 14-18, 2014.

BAJWA, P.K.; SHIREEN, T.; DÁOUST, F; PINEL, D.; MARTIN, V.J.J.; TREVORS, J.T.; LEE, H. Mutans of the pentose-fermenting yeast *Scheffersomyces stipitis* with improved tolerance to inhibitors in hardwoods spent sulfite liquor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 140, p.892-900, 2010.

BEN - BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL (BEN) - Relatório Síntese, ano base 2013. Rio de Janeiro: Ministério de Minas e Energia- MME; Empresa de Pesquisa Energética – EPE, Rio de Janeiro, RJ, Maio de 2014, Disponível em <http://www.epe.gov.br/Estudos/Documents/BEN%202014%20Rel%20S%C3%ADntese%20ab%202013a.pdf> Acesso em 03 de abril de 2015.

BALCU, I.; MACARIE, C.A.; SEGNEANU, A.E.; OANA, R. Combined microwave-acid pretreatment of the biomass, In: PROGRESS in Biomass and Bioenergy Production. SHAUKAT, S. S. INTECH (Ed.), 2011, p. 223-238, ISBN: 978-953-307-491-7, DOI: 10.5772/16484.

BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J. S.; HODGE, D. B.; WALTON, J. D. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, p.16, 2011.

BARON, G. V., WILLAERT, R. G., BACKER, L. Immobilised cell reactors. In: IMMOBILISED living cell systems: Modelling and experimental Methods. John Wiley & Sons Ltda., 1996, p. 67-95.

BASTOS, V. D. **Etanol, alcooquímica e biorrefinarias**, Rio de Janeiro: BNDES Setorial, 2007, n. 25, p.5-38.

BEHERA, S.; KAR, S.; MOHANTY, R.C.; RAY, R.C. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca alginate matrices. **Applied Energy**, v. 87, p. 96-100, 2010.

BEHERA, S.; MOHANTY, R. C.; RAY, R. C. Ethanol fermentation of sugarcane molasses by *Zymomonas mobilis* MTCC 92 immobilized in *Luffa cylindrica* L. sponge discs and Ca-alginate matrices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.4, p. 1499-1507, 2012

BERG, C. **World Fuel Ethanol Analysis and Outlook**. Prepared for Ministry of Economy, Trade and Industry METI by Dr. Christoph Berg, Japão: F. O. Licht, 2003, Disponível em <http://www.meti.go.jp/report/downloadfiles/g30819b40j.pdf> Acesso em 03 de abril de 2015.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v.3, p. 286–295, 1985.

BINOD, P; SATYANAGALAKSHMI, K.; SINDHU, R.; JANU, K.U.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v.37, p. 109-116, 2012.

BJERRE A.B.; OLESEN A. B.; FERNQVIST T.; PLOGER A.; SCHMIDT A. S. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose, **Biotechnology Bioengineering**, v. 49, p. 568-77,1996.

BLEEK, C. V. D.; SCHOUTEN, J. C. Can deterministic chaos create order in fluidized-bed scale-up? **Chemical Engineering Science**, v. 48, n. 13, p. 2367-2373, 1993.

BLOMGREM,P.; PALACIOS,A.; ZHU,B.; DAW,S.; FINNEY, C.; HALOW, J. E PANNALA,S. Bifurcation analysis of bubble dynamics in fluidized beds, **Chaos**, v.17, 2007.

BOCCHINI, D. A.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; GOMES E.; SILVA, R. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbono sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3653–3659, 2005.

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

BRENA, B. M; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes, In: IMMOBILIZATION of enzymes and cells, Ed. GUISAN, J. M. New Jersey: Humana Press Inc., 2006. ISBN 1-59745-053-7.

BRUNOW, G.; LUNDQUIST, K.; GELLERSTEDT, G. Lignin. In: ANALYTICAL methods in wood chemistry, pulping, and papermaking. Eds. Sjöström, E., Alén, R., Berlin: Springer – Verlag, Berlin, 1999, p. 77-124.

BURA, R.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. **Biotechnology Progress**, v. 25, p. 315-322, 2009.

CADETE, R. M.; MELO, M.A. ; DUSSAN, K. J. ; RODRIGUES, R. C. L. B. ; SILVA, S. S.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S. ; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. . Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **Plos One**, v. 7, p. e43135, 2012.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A.; SPERA, A.; ALFANI, F. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. **Process Biochemistry**, v.39, p. 1533–1542, 2004.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v.101, p.4754–4766, 2010.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 849-864, 2008.

CARVALHO, W.; BATISTA, M. A.; CANILHA, L.; SANTOS, J. C.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Sugarcane bagasse hydrolysis with phosphoric and sulfuric acids and hydrolysate

detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 1308-1312, 2004.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Semi-continuous xylose-to-xylitol bioconversion by Ca-alginate entrapped yeast cells in a stirred tank reactor. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v.31, p. 493–498, 2008.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Semi-continuous xylitol bioproduction in sugarcane bagasse hydrolysate: effect of nutritional supplementation RBCF. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)**, v. 43, p. 47-53, 2007. (Cessou em 2008. Cont. ISSN 1984-8250).

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C.; CONVERTI, A. Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.553-9, 2003.

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; VITOLO, M.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; Improvement in xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate achieved by the use of a repeated-batch immobilized cell system. **Z. Naturforsch**, v. 57, p. 109-112, 2002.

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

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

CHANDEL, A. K.; GIESE, E.C.; ANTUNES, F. F. A.; OLIVEIRA, I. S.; SILVA, S. S. Pretreatment of sugarcane bagasse and leaves: Unlocking the treasury of “Green currency” In: PRETREATMENT techniques for biofuels and biorefineries, Editado por Fang Zhen, Beijing, China: Springer-Verlag, Springer Asia Limited, 2012, pp 369-391.

CHANDEL, A. K ; ANTUNES, F. A. F.; ANJOS, V. ; BELL, M. J. ; RODRIGUES, L. N.; SINGH, O. V.; ROSA, C. A.; PAGNOCCA, F. C. Silva, S. S. Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Biofuels**, v. 6, p. 4, 2013.

CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. **BioEnergy Research**, v. 6, p. 388-401, 2013.

CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. In: BIOFUEL production recent developments and prospects, Editado por BERNARDES, M. A. S., xed.Rijeka, Croatia: InTech Open Access Publisher, 2011, p. 225-246.

CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A. F.; ANJOS, V.; BELL, M. J. V.; RODRIGUES, L. N.; POLIKARPOV, I.; DE AZEVEDO, E. R.; BERNARDINELLI, O. D.; ROSA, C. A.; PAGNOCCA, F. C.; da Silva, S. S. Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid-base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 63, 2014.

CHEN, K.C.; HUANG, C.T. Effects of the growth of *T. cutaneum* in calcium alginate gel beads upon bead structure and oxygen transfer characteristics. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.284-92, 1988.

CHENG, K. K.; CAI, B. Y.; ZHANG, J. A.; LING, H. Z.; ZHOUA, Y. J.; GEB, J. P.; XUA, J. M. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 105–109, 2008.

CHENG, K. K.; ZHANG, J. A.; LING, H.Z.; PING, W.X.; HUANG, W.; GE, J.-P.; XU, J. M. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 203–207, 2009.

CHENG, K.; LIU, Q.; ZHANG, JI.; LI, J.; XU, J.; WANG G. Improved 2,3-butanediol production from corncob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. **Process Biochemistry**, v.45 p. 613–616, 2010.

CHORNET, E.; OVEREND, R. P. Phenomenological kinetics and reaction engineering aspects of steam/aqueous treatments. In: STEAM explosion techniques: fundamentals and industrial applications : Proceedings of the international workshop on steam explosion techniques: fundamentals and industrial applications, FOCHER, B.; MARZETTI, A.; CRESCENZI, V. (Ed.), Milan, Italy: CRC PRESS, 1988, p. 21-58.

CHUM, L.H.; OVEREND, R.P. Biomass and renewable fuels. **Fuel Bioprocess Technology** v. 17, p. 187–195. 2001.

CINELLI, B. A.; Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial. 2012. 183 p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

CONAB 2014 - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA: CANA-DE-AÇÚCAR. - Safra 2014/15 - V. 1 N. 2 - Segundo Levantamento - Agosto/2014 Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_28_08_52_35_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_2014-15.pdf Acesso 03 de abril de 2015.

CORTEZ, L.A.B. Bioetanol de cana de açúcar. P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher, 2010

COVIZZI, L.G.; GIESE, E.C.; GOMES, E.; DEKKER, R.F.H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.28, n.2, p.143-160, 2007.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology**: a textbook of Industrial Microbiology. Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1993, 368 p.

CUI, F.; LI, Y.; WAN, C.; Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1831-6, 2011.

CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L.R.; SEHNEM, N.T.; SOUZA-CRUZ, P.B.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**. v.102, p.4218-4225, 2011.

DHANASEKARAN, D.; LAWANYA, S.; SAHA, S.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. Production of single cell protein from pineapple waste using yeast. **Journal Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 8. P. 26-32, 2011.

DIAS, J. C .T.; REZENDE, R. P.; LINARDI, V.R. Effects on Immobilization in Ba-Alginate on nitrite-dependent Oxygen uptake Rates of *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.221-224, 2001.

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

DING, X. Fermentation of xylitol using immobilized *Candida* sp.ZU04 cells in three-phase fluidized-bed bioreactor, Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering (RSETE), International Conference on. 24-26 June 2011, Nanjing China, p. 7591 – 7593.

DOAA, A. R. M.; WAFAA A. H. Potential application of immobilization technology in enzyme and biomass production (Review Article). **Journal of Applied Sciences Research**. v. 5, p. 2466-2476, 2009.

DOGARIS, I.; VAKONTIOS, G.; KALOGERIS, E.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. **Industrial Crops and Products**. v. 29, p. 404-411, 2009.

DONG, K.; ZHANG, S. J. Hydrogen bonds: a structural insight into ionic liquids. **Chemistry – A European Journal**, v. 18, n.10, p. 2748–2761, 2012.

DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A.; The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.23, p. 228-233, 1986.

DU PREEZ, J. C.; VAN DER WALT J. P. Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 5, n.5, p.357-362, 1983.

DU PREEZ J.C.; PRIOR B. A.; MONTEIRO A. M. T. The effect of aeration on xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pachysolen tannophilus* A comparative study, **Applied Microbiology Biotechnology**, v.19, p. 261-266, 1984.

GOVERNO eleva mistura de etanol na gasolina para 27%. **Exame.com**, 02.fev.2015 Disponível em <http://exame.abril.com.br/economia/noticias/governo-eleva-mistura-de-etanol-na-gasolina-para-27>, Acesso em 03 de abril de 2015.

FELIPE, M. G. A.; ALVES, L. A.; SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; SILVA, J. B. A. Fermentation of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v. 56, n. 2-3, p. 281-283,1996.

FELIPE, M.G.A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v.35, p.171-177, 1995.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood**: chemistry, ultrastructures, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1983.

FERRARI, M.E.; NEIROTTI, E.; ALBORNOZ, C.; SAUCEDO, E. Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Biotechnology Bioengineering**, v.40, p.753-759, 1992.

FERREIRA, A. D.; ROSA, C. A.; CADETE, R. M.; SILVA, S. S.; MUSSATTO, S. I. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, v. 28, p. 547-554, 2011.

FLICKINGER, M.C.; DREW, S.W. Energy metabolism, microbial and animal cells. **Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis**, v. 2, p. 939, 1999.

GAO, M.; XU, F.; LI, S.; JI, X.; CHEN S.; ZHANG D. Effect of scCO₂ pretreatment in increasing rice straw biomass conversion. **Biosystems Engineering**, v. 106, p. 470–475, 2010.

GARCÍA-CUBERO, M. T.; COCA, M.; BOLADO, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G. Chemical Oxidation with ozone as pre-treatment of lignocellulosic materials for bioethanol production, **Chemical engineering transactions**, v. 21, 2010.

GARCÍA-MARTÍNEZ, T.; PUIG-PUJOL, A.; PEINADO, R. A.; MORENO, J.; MAURICIO, J. C. Potential use of wine yeasts immobilized on *Penicillium chrysogenum* for ethanol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 351–359, 2012.

GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **European Journal of Wood And Wood Products**, v. 57, 191–202, 1999.

GE, J.; LIU, G.; YANG, X.; SUN, H.; LING, H.; PING, W. Optimization of xylose fermentation for ethanol production by *Candida shehatae* HDYXHT-01. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 404-11, 2011.

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

GLASSER, WG; WRIGHT, RS. Steam-assisted biomass fractionation. ii. fractionation behavior of various biomass resources **Biomass and Bioenergy**, v 14, n 3, 219-235 (1998).

GLICKSMAN, L. R., Scaling relationships for fluidized beds. **Chemical Engineering Science**, v. 39, p. 1373-1379, 1984.

GÖKSUNGUR, Y.; ZORLU, N. Production of ethanol from beet molasses by Ca-alginate immobilized yeast cells in a pack-bed bioreactor. **Turkish Journal Biotechnology**. v.25, p. 265-275, 2001.

GOLDEMBERG, J. The ethanol program in Brazil, **Environmental Research Letters**, v.1, 2006, doi:10.1088/1748-9326/1/1/014008.

GOLDEMBERG, J. Review Open Access The Brazilian biofuels industry, **Biotechnology for Biofuels**, doi:10.1186/1754-6834-1-6, 2008.

GOMES, S. D. L.; ALBUQUERQUE, T. L.; JUNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Produção de xilitol e etanol a partir de hidrolizado enzimático de bagaço de caju, Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 1, In : X CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2014. doi: 10.5151/chemeng-cobec-ic-07-cb-149.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1500–1503, 2009.

GROVER, B.P.; GARG, S.K.; VERMA, J. Production of 2,3-butanediol from wood hydrolysate by *Klebsiella pneumonia*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 328-332, 1990.

GUO, Q.; YUE, G.; SUDA, T.; SATO, J. Flow characteristics in a bubbling fluidized bed at elevated Temperature, **Chemical Engineering and Processing** , v.42, p. 439-447, 2003.

GUO, Y.; JIANG, Z.; TENG, C.; YAN, Q. Efficient production of lactic acid from sucrose and corncob hydrolysate by a newly isolated *Rhizopus oryzae* GY18. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.37, p. 1137-43, 2010. doi: 10.1007/s10295-010-0761-2.

HA, S.J.; GALAZKAC, J.M.; KIMA, S.R.; CHOIA, J.H.; YANG, X.; SEOE, J.H.N.; GLASSF, L.; CATEC, J.H.D.; JINA, Y.S. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v.108, p. 504–509, 2011.

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

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 16, p. 933-942, 1994.

HAN, J.S.; ROWELL, J.S. Chemical composition of fibers. In: Rowell, R. M.; Young, R. A.; Rowell, J. **Paper and Composites from Agro-Based Resources**, Boca Raton, Florida. EUA: CRC Press, 1996, pp.83-134.

HANDE, A.; MAHAJAN. S.; PRABHUNE, A. Evaluation of ethanol production by a new isolate of yeast during fermentation in synthetic medium and sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate, **Annals of Microbiology**, v.63, n. 1, p. 63-70, 2012.

HANG, Y.D.; WOODAMS, E.E.; Grape pomace: a novel substrate for microbial production of citric acid. **Biotechnology Letters**, v.7, p.253–254, 1985.

HARMSSEN, P.F.H.; HUIJGEN, W.J.J.; BERMÚDEZ LOPEZ, L.M.; BAKKER, R.R.C. Literature Review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. **Food and Biomass Research**, 2009.

HEREDIA-OLEA, E.; PÉREZ-CARRILLO, E.; SERNA-SALDÍVAR, S.O. Production of ethanol from sweet sorghum bagasse pretreated with different chemical and physical processes and saccharified with fiber degrading enzymes, **Bioresource Technology**, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.162>.

HOLTZAPPLE, M.T., HUMPHREY, A.E. The effect of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. **Biotechnol Bioeng**, v.26, p. 670–676, 1984.

HOU-RUI, Z.; XIANG-XIANG, Q.; SILVA, S. S. ; SARROUH, B. F. ; AI-HUA, C.; YU-HENG, Z.; KE, J.; QIU, X. Novel Isolates for Biological Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysate. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 152, p. 199-212, 2009.

HU, Z.; WEN, Z. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment, **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 369–378, 2008.

HUANG, R.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. Bioconversion of lignocellulosic into bioethanol: process intensification and mechanism research. **Bioenergy Research**, v.4, p. 225-245, 2011.

IVANOVA, V.; PETROVA, P.; HRISTOV, J. Application in the ethanol fermentation of immobilized yeast cells in matrix of alginate/magnetic nanoparticles, on chitosan-magnetite

microparticles and cellulose-coated magnetic anoparticles, **International Review of Chemical Engineering**, v. 3, 2011.

JARDIM, A. Bioeletricidade a energia que vem da nossa terra. **Revista brasileira de energia**, v. 13, n.2, p. 9-18, 2007.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion Biotechnology**, v.7, p. 320-326, 2006.

JEFFRIES, T. W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.27, p.1-32, 1983.

JEFFRIES, T.W.; JIN, Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.63, p.495-509, 2004.

JOSHI, B.; BHATT, M. R.; SHARMA, D.; JOSHI, J.; MALLA, R.; SREERAMA, L. Review lignocellulosic ethanol production: current practices and recent developments. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 1, p. 172-182, 2011.

KAPDAN I. K.; KARGI F.; OZTEKIN, R. Effects of operating parameters on acid hydrolysis of ground wheat starch: Maximization of the sugar yield by statistical experiment design. **Starch – Stärke**, v.63, p. 311–318, 2011.

KARHUMAA, K.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering. **Yeast**, v. 22, p. 359-368, 2005.

KARKARE, S. B. Immobilized microbial and animal cell as enzyme reactors. In: TAYLOR, R. F. **Protein Immobilization: fundamentals and applications**. New York: Marcel Dekker, 1991, p. 319-38.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana, **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 134-143, 2008.

KLEIN, J.; ZIEHR, H. Immobilization of microbial cells by adsorption. **Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 1-15, 1990.

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

KOO, B.W.; KIM, H. Y.; PARK, N.; LEE, S. M. ; YEO, H.; CHOI, I. G. Organosolv pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and simultaneous saccharification and fermentation for bioethanol production, **Biomass and Bioenergy**, v.3, 2011.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, p.377–397, 2004.

KRISHNAN,C.; SOUSA,L. C.; JIN,M.; CHANG, L.; DALE, B. E.; BALAN, V.; Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 107, n. 3, 2010.

KSUNGUR, Y. G.; ZORLU, N. Production of ethanol from beet molasses by ca-alginate immobilized yeast cells in a packed-bed bioreactor. **Turkish Journal of Biology**, v.25, p. 265-275, 2001.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: Current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, p.151-173, 1993.

KUMAR, P.; BARRET, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009.

KUNII, D.; LEVENSPIEL, O. **Fluidization engineering**. New York: John Wiley & Sons, 1969.

KUYPER, M.; WINKLER, A.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. **FEMS Yeast Research**, v.4, p.655-664, 2004.

LAOPAIBOON, P.; THANI, A.; LEELAVATCHARAMAS, V.; LAOPAIBOON, L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production, **Bioresource Technology**, v. 3, p. 1036-43, 2010.

LATIF, F.; RAJOKA, M. I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 77, p.57-63, 2001.

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

LEE, J.M. ; VENDITTI, R. A; JAMEEL, H.; KENEALY, W.R. Detoxification of woody hydrolyzates with activated carbon for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, **Biomass and bioenergy**, v.35, p. 626-636, 2011.

LI, L.; LI, K.; WANG, K.; CHEN, C.; GAO, C.; MA, C.; XU, P. Efficient production of 2,3-butanediol from corn stover hydrolysate by using a thermophilic *Bacillus licheniformis* strain. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 256-61, 2014.

LIN, C.; WU, S.; CHANG, J. Fermentative hydrogen production with a draft tube fluidized bed reactor containing silicone-gel-immobilized anaerobic sludge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 31, p. 2200-2210, 2006.

LOHMEIER-VOGEL, E.M.; SOPHER, C.R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 75-81, 1998.

LU, X.; XI, B.; ZHANG, Y.; ANGELIDAKI, I. Microwave pretreatment of rape straw for bioethanol production: Focus on energy efficiency. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7937–7940, 2011.

MAHIN A. A.; SHARIFUZZAMAN A. B. M.; FARUK M. O.; KADER M. A.; ALAM J., BEGUM R.; RASHID, H. O. Improved citric acid production by radiation mutant *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse extract. **Biotechnology**, v. 11, p. 44-49, 2012.

MARTÍN, C.; PULS, J.; SAAKE, B.; SCHREIBER, A. Effect of glycerol pretreatment on component recovery and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Cellulose Chemistry Technology**, v. 45, p. 487-494, 2011.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M.E.; YORK, S.W.; PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Effects of Ca(OH)₂ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates, **Biotechnology and Bioengineering**, v.69, n.5 , 2000.

MARTINS, D. S. S.; BORGES SR., E. R.; JARAMILLO, L.; LARA, A.; SILVA, D.; ANNA, L. M. M. S.; PEREIRA JR SR., N. Lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* employing lignocellulosic biomass. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, April 28 - May 01, Clearwater Beach, FL, USA, 2014.

MARUTHAI, K.; THANGAVELU, V.; KANAGASABAI, M. Statistical screening of medium components on ethanol production from cashew apple juice using *Saccharomyces diasticus*. **International Journal of Chemical and Biological Engineering**, v.6, p.108-111, 2012.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, n.7, p. 509-515, 2000.

MEENA K.; RAJA T. K. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* cells by gel entrapment using various metal alginates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 651-653, 2006.

MEGAWATI, SEDIAWAN, W. B.; SULISTYO, H.; HIDAYAT, M. Kinetics of sequential reaction of hydrolysis and sugar degradation of rice husk in ethanol production: effect of catalyst concentration. **Bioresource Technology**, v.102, p. 2062-2067, 2011.

MEHTA, R. V.; UPADHYAY, R. V.; CHARLES, S. W.; RAMCHAND, C.N. Direct binding of protein to magnetic particles., **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 493-496, 1997.

MEINITA, M. D. N. ; HONG, Y. ; JEONG, G. Detoxification of acidic catalyzed hydrolysate of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii), **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 1-2, p. 93-98, 2012.

MILESSI, T. S. S. Imobilização de células de *Scheffersomyces stipitis* para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta. 2012, 142 p. (Dissertação de Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S. Hemicellulosic ethanol production by immobilized cells of *Scheffersomyces stipitis* : effect of cell concentration and stirring. **Bioengineered**, v. 6, p. 01-07, 2015.

MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. **3 Biotech**, v. 3, n. 5, p. 373-379, 2012.

MILLER, E.N.; TURNER, P.C.; JARBOE, L.R.; INGRAM, L.O. Genetic changes that increase 5-hydroxymethyl furfural resistance in ethanol-producing *Escherichia coli* LY180. **Biotechnology Letters**, v.32, p.661-667, 2010.

MILLS, T.Y.; SANDOVAL, N.R.; GILL, R.T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. **Biotechnology for Biofuels**, v.2, p.26, 2009.

MODIG, T.; LIDÉN, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 363, p. 769-776, 2002.

MOLWITZ, M., SILVA, S. S., RIBEIRO, J. D., ROBERTO, I. C., FELIPE, M. G. A., PRATA, A. M. R., MANCILHA, I. M. aspects of the cell growth of *Candida guilliermondii* in sugar cane bagasse hydrolisate. Journal of Biosciences, v. 51c, p. 404-8, 1996.

MORENO, A. D.; IBARRA, D. ; FÉRNANDEZ, J. L. ; BALLESTEROS, M. Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Bioresource Technology**, v. 106, p. 101-109, 2012.

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

MOUTA, R.O.; CHANDEL, A. K.; RODRIGUES, R. C. L. B.; SILVA, M. B.; ROCHA, G. J. M.; SILVA, S.S. Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process. **Sugar Technology**, v.14, n.1, p. 53-60, 2011.

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

MUSSATTO, S. I.; MACHADO, E. M. S.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues, **Food Bioprocess Technology**, v.4, p. 661–672, 2011.

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

MUSTAFA, B. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v.52, p.858-875, 2011.

NADEEM, M.; REHMAN, S.U.; AHMAD, F.; MUSHTAQ, Z. Biotechnological production of xylitol from dried banana peel hydrolysate and its impact on physicochemical properties of rusks. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 11, n. 1, pp. 2-14, 2012.

NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; ISMAIL, K. K.S. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*, **Bioresource Technology**, v. 92 ,p. 251–260, 2004.

NGUYEN, N.H.; SUHA, S-O.; MARSHALL, C.J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v.110, p.1232-1241, 2006.

NIGAM, J.N. Cultivation of *Candida langeronii* in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for the production of single cell protein. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16, p. 367-372, 2000a.

NIGAM, J.N. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cell. **Journal of Biotechnology**, v. 80, 2000b.

NILVEBRANT, N.; REIMANN, A.; LARSSON, S.; JÖNSSON, L. J. Detoxification of lignocelluloses hydrolysates with ion-exchange resins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91, p.35-49, 2001.

OGBONNA, J. C.; AMANO, Y.; NAKAMURA, K.; J. Evaluation of some gelling agents for immobilization of aerobic microbial cells in alginate and carrageenan gel beads. **Fermentation Bioengineering**, v.67, 1989.

OLIVEIRA, M. Biorrefinarias do futuro, **Revista Pesquisa Fapesp**, v.192, pp 28-31, 2012.

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

OMAR, S.H. Oxygen diffusion through gels employed for immobilization. 2 - In the presence of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p. 173-81, 1993.

OVEREND, R. P.; CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steamaqueous pretreatments Philos. **Transactions of the Royal Society of London**, v. 321, p. 523–536, 1987.

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

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

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

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v.66, p.25-40, 1998.

PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. **Critical Review Biotechnology** v. 31, p.20-31, 2011.

PAREKH, S.R.; YU, S.; WAYMAN, M. Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolysates for increased ethanol production. **Aspen Bibliography**, v. 25, p. 300-304, 1986.

PARK, J. K.; H. N. CHANG. Microencapsulation of microbial cells, **Biotechnology Advances**, v. 18, n.4, p. 303-319, 2000.

PASCOLI, D. U. ; MILESSI, T. S. S. ; ANTUNES, F. A. F. ; SILVA S. S. Influência da concentração de cloreto de cálcio na imobilização de *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* visando a produção de bioetanol. IN: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 20º, 2012, São Paulo. **Anais** do XII Encontro Latino Americano de Pós Graduação, 2012.

PEART, P. C.; CHEN, A. R. M.; REYNOLDS W. F.; REESE, P.B. Entrapment of mycelial fragments in calcium alginate: A general technique for the use of immobilized filamentous fungi in biocatalysis. **Steroids**, v. 77, p. 85-90, 2012.

PEREZ-BIBBINS,B; TORRADO-AGRASAR, A.; SALGADO, J. M.; MUSSATTO, S. I.; DOMINGUEZ, J.M. Xylitol production in immobilized cultures: a recent review. **Critical Review in Biotechnology**, v. 10, p. 1-14, 2015.

PHAN, D. T.; TAN, C-S. Innovative pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical CO₂ followed by alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technology**, v. 167, p.192–197, 2014.

PHILIPPINI, R. R. **Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar**: Caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas, 2012, 82p. (Dissertação de Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

PHISALAPHONG, M.; BUDIRAHARJO, R.; BANGRAK, P.; MONGKOLKAJIT, J.; LIMTONG, S. Alginate-loofa as carrier matrix for ethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, n. 3, p. 214-217, 2007.

PHOWCHINDA, O.; DÉLIA-DUPUY, M.L.; STREHAIANO, P. Effects of acetic acid on growth and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 2, p. 237-242. 1995.

PRAKASHAM, R. S.; SREENIVAS, R.; HOBBS, P. H. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. **Currents Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 3, p. 8-36, 2009.

PRATA, A. M. R.; SANTOS, R. S. Estudo da obtenção de ácido cítrico por *aspergillus niger* a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. IN: Simposio Nacional de Fermentação, 14º, 2003.

PUETTMANN, A.; HARTGE, E.-U.; WERTHER J., Application of the flowsheet simulation concept to fluidized bed reactor modeling. Part I: Development of a fluidized bed reactor simulation module. **Chemical Engineering and Processing**, v. 60, p. 86– 95, 2012.

RABELO, S. C.; ANDRADE, R. R.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol, **Fuel**, v. 136, p. 349–357, 2014.

RAJAGOPALAN,G.; KRISHNAN, C. a-Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3044–3050, 2008.

RAO, R. S.; JYOTHI, C. P.; PRAKASHAM, R. S. SARMA, P. N.; RAO, V. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*, **Bioresource Technology**, v.97,p. 1974–1978, 2006.

RFA - RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, World Fuel Ethanol Production - 2014 World Fuel Ethanol Production , 2015. Disponível em <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production> . Acesso em 03 de abril de 2015.

RICHARDSON, J. F.; ZAKI, W. N. Sedimentation and fluidisation: Part I. **Trans Inst Chem Eng**, v.32, p. 35–53, 1954.

RILEY, M.R.; MUZZIO, F.J.; BUETTNER, H.M. REYES, S.C. A simple correlation for predicting effective diffusivities in immobilized cell systems. **Biotechnology Bioengineering**, v. 49, p. 223–227, 1996.

ROBERTO, I. C., MUSSATTO, S. I., RODRIGUES, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, p. 171-6, 2003.

ROCA, E.; CAMESELLE, C.; NUNEZ, M. J.; LEMAS, J.M. Continuous ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in Ca-Alginate beads hardened with Al_3^+ . **Biotechnology techniques**, v.9, p. 815-820,1995.

ROCHA. G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A. M. S.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M.; Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.;ROSSELLA, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v.35, p. 274–279, 2012.

RODMUI, A.; KONGKIATTIKAJORN, J.; DANDUSITAPUN, Y. Optimization of agitation conditions for maximum ethanol production by coculture. **Kasetsart Journal**, v.42, p.285-293, 2008.

RODRIGUEZ-CHONG, A.; ALBERTO, R. J.; GARROTE, G.; VAZQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 61, n. 2, p. 143-152, 2004.

ROWELL, R.M.; PETTERSEN, R.; HAN, J.S.; ROWELL, J.S.; TSHABALALA, M.A. Cell Wall Chemistry. In: **HANDBOOK of wood chemistry and wood composites**. ROWELL, R.M. (Ed.), Boca Raton,FL: CRC Press, 2005,p. 35-74.

SAHA, B. C.; NICHOLS, N. N.; QURESHI, N.; KENNEDY, G. J.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A. Pilot scale conversion of wheat straw to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation, **Bioresource Technology**, v. 175, p. 17–22, 2015.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SANTANA, L. N. S.; CORDEIRO, P. T; OLIVEIRA-LOPES, L. C.; RIBEIRO, E. J. Estudo cinético da produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de sódio, IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8º, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2009.

SANTOS, J. C.; SILVA, S. S.; MUSSATTO, S. I.; CARVALHO, W ; CUNHA, M. A. A. Immobilized cells cultivated in semi-continuous mode in a fluidized bed reactor for xylitol production from sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 531-535, 2005.

SANTOS, J.C. **Processo fermentativo de obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado: avaliação das condições operacionais**. 2005, 199 p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Engenharia de Lorena, Lorena, 2005.

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

SARROUH, B. F.; SILVA, S. S. Application of response surface methodology for optimization of xylitol production from lignocellulosic hydrolysate in a fluidized bed reactor. **Chemical Engineering & Technology**, v.33, p. 1481-1487, 2010.

SARROUH, B. F.; SILVA, S. S. . Evaluation of the performance of a three-phase fluidized bed reactor with immobilized yeast cells for the biotechnological production of xylitol. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 6, p. 1-15, 2008.

SARROUH, B. F. **Estudo da Produção Biotecnológica de Xilitol em Reator de Leito Fluidizado Utilizando Bagaço de Cana-de-açúcar e Células Imobilizadas: Avaliação de Parâmetros Operacionais e Viabilidade Econômica**. 2009, 185 p. (Tese de Doutorado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SARROUH, B. F.; BRANCO, R. F.; SILVA, S.S. biotechnological production of xylitol: enhancement of monosaccharide production by post-hydrolysis of dilute acid sugarcane hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, p. 163-170, 2009.

SARROUH, B.; SILVA, S. S. Repeated Batch Cell-Immobilized System for the Biotechnological Production of Xylitol as a Renewable Green Sweetener. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, p. 1-12, 2013.

SARROUH, B. F.; SANTOS, D. T.; SILVA, S. S. Biotechnological production of xylitol in a three-phase fluidized bed bioreactor with immobilized yeast cells in Ca-alginate beads. **Biotechnology journal**, v.2, p-759-763, 2007.

SCHMIDELL, W. Transferência de oxigênio em biorreatores. SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U. A; AQUARONE, E. (Ed.), In: BIOTECNOLOGIA industrial. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, 541p.

SCHOUTEN, J.C.; VANDER STAPPEN, M.L.M.; VAN DEN BLEEK, C.M. Scale-Up of chaotic fluidized bed. **Chemical Engineering**, v. 51, n.10, p. 1991-2000, 1996.

SCORDIA, D.; COSENTINO, S. L.; JEFFRIES, T. W. Second generation bioethanol production from *Saccharum spontaneum* L. ssp. *aegyptiacum* (Willd.) Hack. **Bioresource Technology**, v.101, p. 5358–5365, 2010.

SENTHURAN, A.; SENTHURAN, V.; MATTIASSON, B.; KAUL, R. Lactic acid fermentation in a reactor using immobilized *Lactobacillus casei*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 55, p. 841–853, 1997.

SHIDA, G. M.; BARROS, A. R. REIS, C. M.; AMORIN, E. L. C.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; SILVA, E. L. Long-term stability of hydrogen and organic acids production in an anaerobic fluidized-bed reactor using heat treated anaerobic sludge inoculum. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, p. 3679-3688, 2009.

SILVA, J.P.A.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. The influence of inicial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.162, p.1306-1315, 2010.

SILVA, V.F.N.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A.; GONÇALVES, A.R.; ROCHA, G.J.M. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 38, p. 809-817, 2010.

SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; MICHELIN RAMOS, M. E., CARTER, J. M.; PRADELLA, J. G.; GOMEZ, J.G. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate, **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.31, p.245-254, 2004.

SILVA, V.F.N.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A.; GONÇALVES, A.R.; ROCHA, G.J.M. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane

bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 38, p. 809-817, 2010.

SILVA, A. S.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BON, E. P. S. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v.101, p. 7402–7409, 2010.

SINGH, A.; SHARMA, P.; SARAN, A. K.; SINGH, N.; BISHNOI N. R. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. **Renewable Energy**, v. 50, p. 488- 493, 2013.

SJOLANDER, N. O.; LANGLYKKE, A. F.; PETERSON, W. H. Butyl alcohol fermentation of wood sugar, **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 30, n.11, 1938.

SJÖSTRÖM, E. Wood Polysaccharides. **In: Wood chemistry: Fundamentals and applications**, New York: Academic Press, 1993. Cap. 3, p. 54-70.

SPENCER-MARTINS, Transport of sugars in yeasts: implications in the fermentation of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v.50, p. 51-57, 1994.

STASIAK-RÓŻAŃSKA, L.; BŁĄŻEJAK, S.; MIKLASZEWSKA, A. - Application of immobilized cell preparation obtained from biomass of *gluconacetobacter xylinus* bacteria in biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone. **ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v.10, p. 35-49, 2011.

SUN, W. L.; TAO, W.Y. Comparison of cell growth and ethanol productivity on different pretreatment of rice straw hemicellulose hydrolysate by using *Candida shehatae* CICC 1766. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 1105-1109, 2010.

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

SUN, Y.; FURUSAKI, S. Continuous production of acetic acid using immobilized acetobacter aceti in a three-phase fluidized bed bioreactor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.69, n.2, p. 102-110, 1990.

TANAKA, T.; HOSHINA,M.; TANABE, S.; SAKAI, K.; OHTSUBO, S.; TANIGUCHI,M. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v.97, p. 211–217, 2006.

TOIVARI M. H.; ARISTIDOU A.; RUOHONEN L.; PENTTILÄ M. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: importance of xylulokinase (XKS1) and oxygen availability. **Metabolic Engineering**, v.3, p. 236-249, 2001.

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR- Etanol Total - 1990/1991 até 2013/2014 - Unidade: Mil m³, 2015. Disponível em http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2&acao=visualizar&idTabela=1611&produto=etanol_total&safraIni=1990%2F1991&safraFim=2013%2F2014&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR
Acesso em 03 de abril de 2015.

URBINA, H.; BLACKWELL, M.; Multilocus phylogenetic study of the *Scheffersomyces* yeast clade and characterization of the n-terminal region of xylose reductase gene. **Plos One**, v.7, n.6, p. 1-13, 2012.

VAN ZYL, C.; PRIOR, B.A; DU PREEZ, J.C. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 357-369, 1988.

VIDAL, P.F.; MOLINIER, J. Ozonolizys of lignin – improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. **Biomass**, v. 16, p. 1-17, 1988.

WANG, B. FENG, H. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates. In: Biofuels from Agricultural Wastes and Byproducts. BLASCHEK, H. P.; EZEJI, T. C.; SCHEFFRAN, J. (Ed.). Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2010.

WENCHAO, J. I.; SHEN, Z.; WEN, Y.; Hydrolysis of wheat straw by dilute sulfuric acid in a continuous mode, **Chemical Engineering Journal**, v. 260, p. 20–27, 2015.

WICKRAMASINGHE, S. R.; GRZENIA, D. L. Adsorptive membranes and resins for acetic acid removal from biomass hydrolysates. **Desalination**, v. 234, 144-151, 2008.

WINKELHAUSEN, E.; KUSMANOVA, S. Microbial conversion of d-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, 1998.

WOHLBACH, D.J.; KUO, A.; SATO, T.K.; POTTS, K.M.; SALAMOV, A.A.; LABUTTI, K.M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGILINAN, J.L.; LINDQUIST, E.A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; JIN, M.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B.E.; JEFFRIES, T.W.; ZINKEL, R.; BARRY, K.W.; GRIGORIEV, I.V.; GASCH, A.P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **PNAS**. v.108, p.13212-13217, 2011.

WU J.Y.; CHEN K.C.; CHEN C.T.; HWANG S.C. Hydrodynamic characteristics of immobilized cell beads in a liquid-solid fluidized-bed bioreactor, v. 5, **Biotechnology Bioengineering**, p. 583-594, 2003.

YADEGARY, M.; HAMIDI, A.; ALAVI, S. A.; KHODAVERDI, E.; YAHAGHI, H.; 5, SATTARI, S.; BAGHERPOUR, G.; YAHAGHI, E. Citric acid production from sugarcane bagasse through solid state fermentation method using *aspergillus niger* mold and optimization of citric acid production by taguchi method. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.6, p.1-6, 2013.

YOUNG, E.; LEE, S.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biotechnology for biofuels**. V. 3., doi:10.1186/1754-6834-3-24, 2010.

ZANIN, G. M. Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada. (Tese de Doutorado). 1989. 454p. - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, Campinas, 1989.

ZHANG, X.; YU, H.; HUANG, H.; LIU, Y. Evaluation of biological pretreatment with white-rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. **Int. Biodiversity. Biodegradation**, v. 60, p.159-164, 2004.

ZHANG, Y.; CHENA, X.; LUOD, J.; QIA, B.; WANA, Y. An efficient process for lactic acid production from wheat straw by a newly isolated *Bacillus coagulans* strain IPE22. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 396-399, 2014.

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. p. 465–482, 2012.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic production. **International Journal of Agricultural & Biology Engineering**, v. 2, p. 51-68, 2009.

ZHU, J.; YONG, Q.; XU, Y.; SHI-YUAN, Y. Comparative detoxification of vacuum evaporation/steam stripping combined with overliming on corn stover prehydrolyzate, **International Conference on Energy and Environment Technology**, p. 240-243, 2009.

ZHUANG, J.; LIN, L.; YONG, S.; PANG C. Detoxification of wheat straw formic acid hydrolysis and xylitol production, **Advanced Materials Research**, v. 383, p. 5453-5457, 2012.

ZHUANG, J.; LIU, Y.; WU, Z.; SUN, Y.; LIN, L. Hydrolysis of wheat straw hemicellulose and detoxification of the hydrolysate for xylitol production, **BioResources**, v.4, n.2, 2009.

ZHUO, K.; DU, Q.; BAI, G.; WANG, C.; CHEN, Y.; WANG, J. Hydrolysis of cellulose catalyzed by novel acidic ionic liquids. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 49–53, 2015.