UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

JULIANA RODRIGUES FONSECA PEREIRA

Avaliação de sistemas de sacarificação e cofermentação simultânea em reatores de coluna visando à produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

LORENA
2018

JULIANA RODRIGUES FONSECA PEREIRA

Avaliação de sistemas de sacarificação e cofermentação simultânea em reatores de coluna visando à produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar dos Santos

VERSÃO ORIGINAL

LORENA
2018

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

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

Pereira, Juliana Rodrigues Fonseca

Avaliação de sistemas de sacarificação e
cofermentação simultânea em reatores de coluna visando
à produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço
de cana-de-açúcar / Juliana Rodrigues Fonseca
Pereira; orientador Dr. Julio César dos Santos -
Versão Original. - Lorena, 2018.
91 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. Reatores de coluna interligados. 2. Hidrólise e
cofermentação simultâneas. 3. Células imobilizadas. 4.
Bagaço de cana-de-açúcar. 5. Scheffersomyces shehatae.
I. Título. II. dos Santos, Dr. Julio César, orient.

Ao Pedro Henrique, meu amor, minha força e minha motivação;
Ao Vagner, meu companheiro e maior incentivador;
Aos meus pais e meu irmão, sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda força e fé que me conduzem em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, Fatima e Carlos, que sempre apoiaram meus sonhos e que estão presentes em todos os momentos dispostos a ajudar no que for preciso.

Ao Vagner, meu amor e grande parceiro, que esteve ao meu lado em todos os momentos, sem nunca me deixar desistir. Essa conquista não seria possível sem você.

Ao meu filho, que mesmo sem entender, me deu forças e motivos para continuar.

Ao meu irmão Fred pela torcida e apoio em todos os momentos.

Ao meu primo Francisco que ajudou a cuidar do meu filho para que eu pudesse terminar esse trabalho.

Aos amigos e familiares que de alguma forma me ajudaram conquistar cada etapa importante da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Júlio César dos Santos, por todos os ensinamentos, mas principalmente pela paciência e compreensão ao longo desse trabalho.

Aos professores da banca examinadora, pela atenção e disposição na leitura e avaliação desta dissertação;

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

Aos meus colegas do grupo de pesquisa LBBSim por toda a ajuda e apoio na realização deste trabalho.

Aos Lucas e ao Ruly pelos ensinamentos e auxílio que foram essenciais para a conclusão dessa pesquisa.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Minha eterna gratidão a todos!

RESUMO

PEREIRA, J. R. F. **Avaliação de sistemas de sacarificação e cofermentação simultânea em reatores de coluna visando à produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.** 2018. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

A produção de biocombustíveis de segunda geração está entre os temas mais pesquisados atualmente. Entre estes, a obtenção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar é de grande interesse nacional, considerando-se a abundância desta matéria-prima no país e a possibilidade de incremento na produção deste álcool sem necessidade de expansão da área plantada. Sob o ponto de vista de produção industrial, no entanto, é fundamental o desenvolvimento de trabalhos visando ao estudo de alternativas de processos e biorreatores susceptíveis de ampliação de escala. Estratégias como sacarificação e fermentação/cofermentação simultâneas (SSF/SSCF) têm sido estudadas e têm como vantagens a intensificação do processo pela redução do custo de investimento e minimização de problemas de inibição de enzimas por produtos. No entanto, neste caso, geralmente o uso de condições não otimizadas (temperatura) para cada passo biológico é desvantajoso. Com o objetivo de superar essa desvantagem, avaliou-se o uso de reatores de coluna interconectados para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar empregando células de *Scheffersomyces shehatae* imobilizadas em alginato de cálcio em sistema SSCF. O bagaço foi previamente pré-tratado por processo alcalino e alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica. Experimentos em SSCF em batelada foram realizados usando duas colunas interconectadas. Uma delas (para hidrólise) foi mantida a 50°C e carregada com bagaço pré-tratado e a outra coluna (para fermentação) foi mantida a 30°C e carregada com células imobilizadas. Meio contendo preparação comercial de celulasas e nutrientes para o micro-organismo foi recirculado entre as colunas. Os efeitos da vazão de recirculação e carga enzimática foram avaliados usando planejamento estatístico como ferramenta. Dados iniciais de hidrólise enzimática em reator de coluna mostraram elevada taxa de reação no início do processo, com redução desta ao longo da hidrólise devido à recalcitrância crescente do material residual à ação enzimática. Os resultados obtidos no planejamento estatístico mostraram que a carga enzimática foi a variável mais influente no processo, embora a vazão de recirculação e a interação entre as variáveis também tenham apresentado efeitos significativos. As condições selecionadas corresponderam a uma vazão de recirculação de 14 mL/min e carga enzimática de 15 FPU/g e os experimentos nestas condições resultaram em valores de fator de rendimento (Y_p/s) de 0,493 g/g, produtividade volumétrica de 0,469 g.L⁻¹.h⁻¹ e eficiência de 96,58%. Além disso, nestas condições, 70,72±1,32 % da celulose presente inicialmente no material e 56,37±0,76 % da hemicelulose foram hidrolisadas. O sistema mostrou-se adequado para realização do processo SSCF, com potencial para ser utilizado para intensificação da produção de etanol 2G em biorrefinarias.

Palavras chave: Reatores de coluna interligados. Hidrólise e cofermentação simultâneas. Células imobilizadas. Bagaço de cana-de-açúcar. *Scheffersomyces shehatae*. Etanol de segunda geração.

ABSTRACT

PEREIRA, J. R. F. **Evaluation of saccharification and simultaneous cofermentation systems in column reactors aiming at the production of ethanol from sugarcane bagasse hydrolyzate.** 2018. 91 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

Currently, the production of second generation biofuels is one of the most researched topics. Among these, the ethanol obtained from sugarcane bagasse is of great national interest, considering the abundance of this raw material in the country and the possibility of increasing the production of this alcohol without the need of expanding the crop area. From viewpoint of industrial production, however, the development of studies of process alternatives and bioreactors adequate for scale up is fundamental. Strategies as saccharification and simultaneous fermentation/cofermentation (SSF/SSCF) have been studied and have as advantages the intensification of the process by reducing the cost of investment and minimizing problems of inhibition of enzymes by hydrolysis products. However, in this case, generally the use of non-optimized conditions (temperature) for each biological step is disadvantageous. In order to overcome this drawback, the use of interconnected column reactors for the production of ethanol from sugarcane bagasse was evaluated using calcium alginate immobilized cells of *Scheffersomyces shehatae* in SSCF system. The bagasse was previously pretreated by alkaline and hydrodynamic cavitation-assisted alkaline process. Batch experiments of SSCF were performed using two interconnected columns. One of them (for hydrolysis) was kept at 50 ° C and loaded with pre-treated bagasse and the other column (for fermentation) was kept at 30 ° C and loaded with immobilized cells. Medium containing commercial preparation of cellulases and nutrients for the microorganism was recirculated between the columns. The effects of recirculation flow and enzymatic loading were evaluated using statistical design as a tool. Initial data on enzymatic hydrolysis in a column reactor showed a high reaction rate at the beginning of the process, with a reduction in the hydrolysis rate along the process due to the increasing recalcitrance of the residual material to the enzymatic action. The results obtained in the statistical design showed that enzymatic loading was the most influential variable in the process, although the recirculation flow rate and the interaction between the variables also had significant effects. The selected conditions corresponded to a recirculation flow rate of 14 mL/min and enzyme loading of 15 FPU/g and the experiments carried out under these conditions resulted in yield factor (Y_p/s) values of 0.493 g/g, volumetric productivity of $0.469 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and fermentation efficiency of 96.58%. Moreover, under these conditions, 70.72 ± 1.32 % of the cellulose initially present in the material and 56.37 ± 0.76 % of the hemicellulose were hydrolyzed. The system proved to be adequate to perform the SSCF process, with potential to be used to intensify the production of 2G ethanol in biorefineries.

Keywords: Interconnected column reactors. Simultaneous hydrolysis and cofermentation. Immobilized cells. Sugarcane bagasse. *Scheffersomyces shehatae*. Second generation ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Opções de bioconversão de biomassa em produtos de valor agregado	21
Figura 2 – Distribuição da Matriz Energética Brasileira	22
Figura 3 – Representação esquemática da composição química de materiais lignocelulósicos	22
Figura 4 – Exemplos de utilizações das frações dos materiais lignocelulósicos	23
Figura 5 – Representação molecular da celulose	26
Figura 6 – Representação esquemática do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos	29
Figura 7 – Atuação conjunta das enzimas do complexo celulolítico	37
Figura 8 – Via metabólica de produção de etanol via fermentação de hexoses em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Figura 9 – Via metabólica para conversão de xilose a etanol	41
Figura 10 – Diferentes configurações de processo para obtenção de etanol 2G	43
Figura 11 – Representação esquemática do sistema de cavitação hidrodinâmica usado para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	51
Figura 12 – Esquema simplificado do reator empregado no projeto para hidrólise enzimática dos polissacarídeos de bagaço de cana-de-açúcar	53
Figura 13 – Esquema simplificado do sistema de colunas interligadas	55
Figura 14 – Análise granulométrica do bagaço moído em moinho de martelo	58
Figura 15 – Concentração de glicose ao longo de 24 h de hidrólise enzimática em reator de coluna empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo alcalino	64
Figura 16 – Concentração de xilose ao longo de 24 h de hidrólise enzimática em reator de coluna empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo alcalino ...	66
Figura 17 – Liberação e consumo de glicose (—♦—) e xilose (—■—) durante o processo de SSCF em colunas interligadas usando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo alcalino assistido por HC e por células imobilizadas de <i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG-HM 52.2	67
Figura 18 – Produção de etanol durante o processo de SSCF em colunas interligadas usando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo alcalino assistido por HC e por células imobilizadas de <i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG-HM 52.2	69
Figura 19 – Gráfico de pareto para a variável dependente produtividade volumétrica (Qp) de acordo com os resultados do planejamento estatístico 2 ² realizado para avaliação da influência das variáveis carga enzimática (A) e vazão de recirculação (C) na produção de etanol durante o processo de SSCF em colunas interligadas usando bagaço de cana-de-	

açúcar pré-tratado por processo alcalino assistido por HC empregando células imobilizadas de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2. Nível de confiança: 90%..

.....71

Figura 20 – Liberação e consumo glicose ( ) e xilose ( ) e produção de etanol ( ) por *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizadas durante o processo de SSCF, realizado nas condições selecionadas, em colunas interligadas usando SCB pré-tratado com CH74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferentes produtos obtidos por via biotecnológica a partir do bagaço de cana-de-açúcar	25
Tabela 2 – Diferentes tipos de processos empregados na etapa de pré-tratamento	30
Tabela 3 – Pesquisas realizadas com a levedura <i>Scheffersomyces shehatae</i> para produção de etanol no Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena-Universidade de São Paulo (EEL-USP)	42
Tabela 4 – Principais técnicas de imobilização celular utilizadas.....	47
Tabela 5 – Suportes utilizados para imobilização celular.....	48
Tabela 6 – Planilha de experimentos conforme planejamento estatístico realizado para avaliação da influência das variáveis vazão de recirculação e carga enzimática na produção de etanol em processo SSCF empregando células de <i>S. shehatae</i> imobilizadas em gel de alginato de cálcio (valores codificados entre parênteses).....	55
Tabela 7 – Caracterização química do bagaço <i>in natura</i>	59
Tabela 8 – Composição química percentual do bagaço <i>in natura</i> : dados da literatura	60
Tabela 9 – Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH	61
Tabela 10 – Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH/H ₂ O ₂ assistido por cavitação hidrodinâmica	62
Tabela 11 – Resultados obtidos nos experimentos de Hidrólise enzimática em frascos Erlemeyer empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo alcalino ...	63
Tabela 12 – Digestibilidade enzimática (% de celulose e hemicelulose hidrolisada) nos processos de SSCF com células imobilizadas de <i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG-HM para produção de etanol	68
Tabela 13 – Produtividade volumétrica, fator de rendimento de substrato em produto (Yp/s) e eficiência obtidos nos experimentos de SSCF com células imobilizadas de <i>Scheffersomyces shehatae</i> UFMG-HM para produção de etanol.	70
Tabela 14 – Condições e principais resultados obtidos no presente trabalho e encontrados na literatura referentes a parâmetros fermentativos de produção de etanol... ..	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
SHF	<i>Separate hydrolysis and fermentation</i>
SSF	<i>Simultaneous saccharification and fermentation</i>
SSCF	<i>Simultaneous saccharification and co-fermentation</i>
BEN	Balanço Energético Nacional
OCDE	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
C5	Pentose
EnG	Endoglucanase
ExG	Exoglucanase
CBH	Celobioidrolases
BG	B-glucosidases
PPP	Via das pentoses fosfato
TAL	Transaldolase
TK	Transcetolase
EMP	Embden-Meyerhoff-Parnas
CBP	<i>Consolidated bioprocessing</i>
CH	Cavitação hidrodinâmica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2. 1 BIOMASSA E PRODUÇÃO DE ENERGIA	20
2. 1. 1 Cana-de-açúcar e a utilização do bagaço como fonte energética.....	23
2. 1. 2 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar	25
2. 2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	27
2. 3 PRÉ-TRATAMENTO DAS MATÉRIAS-PRIMAS LIGNOCELULÓSICAS	28
2. 3. 1 Pré-tratamento alcalino	34
2. 3. 2 Pré-tratamento por cavitação Hidrodinâmica	35
2. 4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE	36
2. 5 FERMENTAÇÃO.....	38
2. 6 DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DE PROCESSOS FERMENTATIVOS..	43
2. 7 BIORREATORES E O USO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS.....	45
3 OBJETIVOS.....	49
4 METODOLOGIA	50
4. 1 MATÉRIA-PRIMA E CARACTERIZAÇÃO	50
4. 2 PRÉ-TRATAMENTO	50
4. 2. 1 Pré - tratamento alcalino	50
4. 2. 2 Pré- tratamento alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica.....	51
4. 3 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE EM FRASCOS ERLENMEYER	52
4. 4 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM REATOR DE COLUNA COM LEITO FIXO PERCOLADO.....	52
4. 5 AVALIAÇÃO DE SISTEMAS SSCF COM COLUNAS INTERLIGADAS.....	53

4. 5. 1 Microrganismo e encapsulamento	53
4. 5. 2 Produção de etanol no processo SSCF.....	54
4. 6 MÉTODOS ANALÍTICOS	56
4. 7 PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
5. 1 GRANULOMETRIA E CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO <i>IN NATURA</i>	58
5. 2 PRÉ –TRATAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO PRÉ- TRATADO.....	60
5. 3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO MATERIAL PRÉ-TRATADO EM FRASCOS ERLENMEYER E EM COLUNA COM LEITO FIXO PERCOLADO	63
5. 4 PRODUÇÃO DE ETANOL NO PROCESSO SSCF.....	66
6 CONCLUSÕES	76
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	77
REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, têm sido intensos os trabalhos de pesquisa visando-se à obtenção de combustíveis alternativos de fontes renováveis, tendo como objetivo a redução no uso de derivados do petróleo. Esta busca é justificada considerando-se diversas preocupações referentes a aspectos econômicos, ambientais e de segurança energética, como a instabilidade global no custo e fornecimento de petróleo. Do ponto de vista ambiental sabe-se do impacto da queima desses combustíveis sobre o meio ambiente e que a redução de gases estufa, como é preconizada no Protocolo de Kyoto e no Acordo de Paris, está atrelada ao aumento da contribuição líquida de biocombustíveis na matriz energética mundial.

Entre as alternativas disponíveis, o etanol pode ser destacado, considerando-se o sucesso de seu uso, puro ou em mistura com a gasolina, em veículos automotores em países como Brasil e EUA. No Brasil, a produção de etanol é feita por fermentação a partir de caldo de cana-de-açúcar ou melaço, sendo importante atividade do setor agroindustrial nacional. Nos EUA, o milho é empregado como matéria-prima, sendo necessária uma etapa de hidrólise do amido antes da fermentação alcoólica.

O etanol produzido a partir de sacaríneos e amiláceos é chamado “de primeira geração” (1G). Este álcool pode também ser obtido a partir de materiais lignocelulósicos, o chamado “etanol de segunda geração” (2G). Neste caso, podem ser usados como matéria prima resíduos e sub-produtos agrícolas e florestais, como bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de arroz, sabugo de milho, etc.

Além da elevada disponibilidade de matérias primas lignocelulósicas no mundo todo, algumas vantagens do etanol de segunda geração, principalmente em comparação ao uso de matérias-primas amiláceas, incluem um maior potencial de redução na emissão de CO₂ quando se considera o balanço global de carbono e o fato de sua obtenção não implicar na competição com a cadeia de produção de alimentos.

Embora intensamente estudada nos últimos anos, a produção de etanol 2G em larga escala ainda apresenta uma série de desafios, indicando a necessidade de mais esforços de pesquisas que favoreçam a rentabilidade de plantas

industriais. Neste sentido, é fundamental a avaliação de novas possibilidades de biorreatores e configurações de processo.

A tecnologia em desenvolvimento para produção de etanol de segunda geração inclui uma etapa (em geral química) de pré-tratamento do material, a qual tem por objetivo aumentar a digestibilidade enzimática da celulose presente. Assim, esta fração do material pode ser hidrolisada por celulasas sob condições brandas de pressão e temperatura, gerando uma solução rica em glicose e que pode ser transformada em etanol por leveduras tradicionalmente empregadas no processo (particularmente *Saccharomyces cerevisiae*). Muitas vezes, o processo de pré-tratamento pode resultar também na hidrólise da hemicelulose, fração do material rica em pentoses (principalmente xilose) e que pode representar até um terço da biomassa presente. As pentoses podem também ser transformadas em etanol, aumentando o rendimento global do processo. Neste caso, no entanto, considerando-se que a *S. cerevisiae* não é capaz de metabolizar naturalmente pentoses, são necessárias leveduras geneticamente modificadas ou outras espécies microbianas.

As etapas biológicas do processo, ou seja, a hidrólise enzimática e a fermentação podem ser realizadas em separado – processo SHF (*separate hydrolysis and fermentation*) ou de forma simultânea – “sacarificação e fermentação simultânea”, SSF (*simultaneous saccharification and fermentation*). A vantagem desta última configuração de processo está relacionada ao fato da hidrólise da celulose ser inibida por produto e, desta forma, a transformação simultânea da glicose em etanol pode favorecer a produtividade e rendimento da etapa enzimática. Em geral, neste caso, as enzimas e os microrganismos são inoculados no biorreator sendo que, caso ocorra concomitantemente a transformação de pentoses em etanol, o processo é chamado sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF, do inglês *Simultaneous Saccharification and Co-fermentation*).

A hidrólise enzimática e fermentação/cofermentação simultânea, no entanto, trata-se de configuração limitada pelas condições do processo, uma vez que as celulasas atuam em uma faixa de temperatura mais elevada em comparação às leveduras empregadas. Diferentes alternativas têm sido avaliadas e, no presente projeto, propõe-se o uso de sistemas com células imobilizadas e reatores de coluna como alternativa para o processo SSCF.

O uso de células imobilizadas apresenta vantagens, como a facilidade de reuso ou uso contínuo dos microrganismos no processo. O potencial de uso de células de *Scheffersomyces shehatae* imobilizadas em gel de alginato de cálcio para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foi demonstrado no Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena-Universidade de São Paulo (EEL-USP) (ANTUNES et al., 2016). Os resultados obtidos estimularam novas propostas e indicaram mais estudos em diferentes biorreatores. Além disso, experimentos de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar foram realizados nos laboratórios do LOT/EEL-USP em biorreatores de leito fixo, tendo sido obtidos resultados promissores (TERÁN-HILARES et al., 2016a).

Reatores de coluna são de fácil construção e favorecem a utilização de elevado teor de sólidos, resultando em melhor aproveitamento do volume do reator e em maior concentração de produto final. Além disso, quando células imobilizadas são empregadas, reatores deste tipo são adequados, pois não impõe elevada tensão de cisalhamento aos suportes de imobilização, como ocorre em reatores de tanque agitado.

Neste contexto, e considerando-se os trabalhos em andamento no LOT/EEL-USP, no presente projeto procedeu-se à avaliação de um sistema com dois reatores de coluna interligados para a produção de etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar, matéria prima selecionada por sua abundância no Brasil. Em um dos reatores, o bagaço compôs um leito fixo para sua hidrólise pela ação de complexo comercial de celulasas, sendo que, na segunda coluna, a qual operou como um biorreator de coluna de bolhas, o leito foi composto por células de leveduras imobilizadas em gel de alginato de cálcio. O meio líquido circulou entre as colunas, as quais estavam ajustadas para as condições de cada bioprocessos – hidrólise ou fermentação. Foram avaliadas condições do processo, como vazão de recirculação e carga enzimática. Para a fermentação, *Scheffersomyces shehatae* foi empregada em sistemas SSCF.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOMASSA E PRODUÇÃO DE ENERGIA

Nos últimos anos tem-se notado um avanço na busca por fontes alternativas de energia, resultando em um desenvolvimento crescente de pesquisas no segmento de energia de fontes renováveis, o que é motivado por diversos aspectos ambientais, sociais e econômicos. Entre os motivos dessa busca por alternativas renováveis, há a preocupação com o esgotamento futuro das reservas de combustíveis fósseis e os impactos da queima destes sobre o meio ambiente (SILVA, 2012; ANDRADE et al., 2017; NEVES, et al. 2016; SANTOS et al., 2018).

Dentre as alternativas sustentáveis para obtenção de energia, tem-se a utilização de biomassa, ou seja, material de origem orgânica animal, vegetal ou microbiana. Este material é capaz de fornecer combustível na forma sólida, líquida ou gasosa, e sua utilização, nas últimas décadas, tem sido considerado um indicativo de desenvolvimento socioeconômico de países industrializados (ERNESTO, 2009; ANWAR et al., 2014).

Os materiais lignocelulósicos são a fonte mais abundante de biomassa, correspondendo a uma rica fonte de carbono subutilizada em todo o planeta. Bilgili e Ozturk (2015) mencionaram que a biomassa proveniente de materiais lignocelulósicos é uma excelente alternativa para produção de energia, pois, além de ser renovável, é uma fonte abundante que pode ser produzida em todos os lugares e apresenta diversas possibilidades de utilização. A Figura 1 apresenta algumas opções de bioconversão de biomassa em produtos de valor agregado.

Figura 1 – Opções de bioconversão de biomassa em produtos de valor agregado

Fonte: Adaptado de Iqbal et al. (2013)

Maior país tropical do mundo, o Brasil destaca-se entre as economias industrializadas na utilização de fontes renováveis em sua matriz energética, e sua característica climática é uma vantagem, pois favorece o cultivo de materiais que se tornam biomassas de alto potencial para obtenção de energia (ERNESTO, 2009). Outro aspecto relevante é que, de acordo com uma pesquisa apresentada pelo Balanço Energético Nacional (BEN – 2017), o Brasil encontra-se em evidência quanto ao uso de energia renovável em sua matriz energética, destacando-se a biomassa de cana-de-açúcar, a qual é seguida da energia hidráulica, lenha e carvão vegetal e lixívia e outros. Dentre as fontes de energia não renováveis, o petróleo e seus derivados seguem como as principais, sendo seguidos de gás natural, carvão mineral e urânio.

O Brasil utilizou, em 2016, 43,5% de energia renovável em sua matriz energética, mantendo-se como país de taxa mais elevada quando comparado com o restante do mundo, que utiliza em média 13,5% de fontes renováveis, sendo que os países participantes da OCDE (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico), que utilizaram no mesmo ano 9,4% de energia renovável (BEN, 2017). Na Figura 2 é apresentada a distribuição da matriz energética Brasileira no ano de 2016.

De acordo com Antunes (2015), como a geração de material lignocelulósico é elevada em decorrência do crescimento do setor agrícola, mesmo diante da crescente utilização desse material, o excedente ainda é da ordem de milhões de toneladas, o que torna importante o desenvolvimento de processos viáveis para melhor utilização desses subprodutos e resíduos, não só do ponto de vista

energético, como também para produção de diferentes produtos úteis no cenário atual.

Figura 2 – Distribuição da Matriz Energética Brasileira

Fonte: Adaptado de Balanço Energético Nacional – (BEN, 2017).

As diferentes utilizações dos materiais lignocelulósicos estão diretamente relacionadas à sua composição química. Estes materiais são constituídos principalmente por três frações macromoleculares, sendo duas delas – celulose e hemicelulose – compostas por carboidratos, os quais formam uma matriz complexa com a lignina, fração de natureza polifenólica (RUBIN, 2008). A Figura 3 apresenta de forma esquemática a composição de materiais lignocelulósicos, enquanto que a Figura 4 mostra algumas das possíveis rotas de utilização dos principais componentes dos materiais lignocelulósicos.

Figura 3 – Representação esquemática da composição química de materiais lignocelulósicos

Fonte: Adaptado de Rubin (2008).

Figura 4 – Exemplos de utilizações das frações dos materiais lignocelulósicos

Fonte: Adaptado de Iqbal et al. (2013)

2. 1. 1 Cana-de-açúcar e a utilização do bagaço como fonte energética

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) foi cultivada pela primeira vez no Sudeste Asiático e Oeste da Índia, sendo atualmente majoritariamente produzida no Brasil (HOFSETZ e SILVA, 2012). Caracteriza-se como uma cultura de bioenergia típica de regiões tropicais que nos últimos anos apresentou uma expressiva intensificação de cultivo diante do cenário mundial de busca por combustíveis renováveis (BENTO et al., 2018).

De acordo com dados do Ministério da Agricultura (2018), a safra 2017/2018 foi de 633,26 milhões de toneladas, que corresponde a 3,6% a menos em relação à safra anterior, que foi de 657,18 milhões de toneladas. Com relação à safra de 2018/2019, estima-se que a produção total chegue a 625,96 milhões de toneladas, o que representaria uma nova queda, sendo essas quedas sucessivas um reflexo da devolução de terras arrendadas e rescisão de contratos com fornecedores (CONAB, 2018).

A cana-de-açúcar é um material versátil que apresenta o bagaço como seu subproduto principal. Esse subproduto é um material fibroso obtido após a extração do caldo de cana-de-açúcar por esmagamento em moinhos. Considerando-se sua produção de cerca de 28% da cana processada (massa úmida) (HOFSETZ e SILVA, 2012; BEZERRA, 2016), prevê-se a obtenção de cerca de 175 milhões de toneladas deste material na safra 2018/2019.

O bagaço de cana-de-açúcar tem potencial para uso em diversas aplicações, inclusive para geração de energia (GUILHERME, 2014). Realmente, a maior parte deste material é queimado nas caldeiras das usinas na geração direta de energia por combustão ou gaseificação, havendo, no entanto, um excedente que não é utilizado (SILVA et al., 2010).

Diante da quantidade de bagaço produzido no Brasil, a produção de etanol a partir desse resíduo agroindustrial torna-se uma oportunidade interessante, pois, em posse de tecnologias adequadas, esse material é passível de conversão em açúcares fermentescíveis, os quais podem ser transformados em etanol (SILVA, 2012). De fato, nos últimos anos tem-se investido muito em tecnologias para o aproveitamento total da cana-de-açúcar visando à utilização do bagaço na produção de etanol combustível. Com a redução do consumo energético nas usinas, o fim das queimadas e o início do recolhimento da palha, a produção de etanol por tonelada de cana processada poderá crescer em torno de 50% com uso do bagaço e palha da cana como matérias primas (LEITE e LEAL, 2007). A utilização desse material é interessante, pois é prontamente disponível nas usinas de produção de etanol de primeira geração, podendo compartilhar as instalações de processos e os equipamentos (ANDRADE, et al. 2017), além de apresentar baixo valor nutritivo, não competindo assim com a cadeia de produção de alimentos (BEZERRA, 2016).

De acordo com Ernesto (2009), o fato da produção da cana-de açúcar ser organizada, desde a lavoura até seu transporte, e dos custos principais do processo ser debitado nos produtos principais (etanol e açúcar), torna o bagaço de cana uma das biomassas com melhores características econômicas e com capacidade de concorrer industrialmente. O bagaço apresenta-se também como importante fonte de carbono para produção biotecnológica de diferentes bioprodutos, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Diferentes produtos obtidos por via biotecnológica a partir do bagaço de cana-de-açúcar

Produto	Referência
Ácido láctico	Martins et al. (2014)
Ácido cítrico	Mahin et al. (2012); Yadergary et al. (2013)
α -Amilase	Rajagopalan e Krishnan (2008)
Xilitol	Sarrouh et al. (2009); Kamat et al. (2013); Arruda et al. (2017); Antunes et al. (2018a)
Biohidrogênio	Lai et al. (2014); Plangklang et al. (2012)
Pululana	Terán-Hilares, et al. (2017c)
Etanol	Santos et al. (2010); Milessi et al. (2012); Chandel et al. (2014); Terán-Hilares et al. (2017b); Antunes et al. (2018b); Terán-Hilares et al. (2018a)

Fonte: Adaptado de Antunes (2015) e Sindhu et al.(2016)

2. 1. 2 Composição química do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana é um material altamente heterogêneo, tendo como componentes principais a celulose (40-45%), hemicelulose (30-35%) e lignina (20-30%), além de constituintes menores (Rueda, 2010; SILVA, 2012; BEZERRA, 2016).

A variedade vegetal, o clima, as propriedades físico-químicas do solo e adubação são alguns dos diversos fatores que podem interferir na composição química do bagaço (ERNESTO, 2009; ANDRADE, et al. 2017); porém, de uma forma geral, os componentes principais variam pouco no teor final.

A celulose é o polímero é o mais abundante na natureza. Trata-se de um homopolissacarídeo fibroso, resistente e insolúvel em água. Possui uma estrutura linear de unidades de D-glicose que estão ligadas por ligações glicosídicas β 1-4 (NELSON e COX, 2014) como representado na Figura 5.

Os grupos hidroxilas presentes na molécula resultam em dois tipos de ligações de hidrogênio: interações intermoleculares (que ocorrem entre moléculas de cadeias adjacentes) e intramoleculares (que ocorrem entre moléculas de glicose adjacentes, dentro da mesma cadeia) (MARABEZI, 2009).

As interações de hidrogênio intra e intermolecular possibilitam uma estrutura organizada na celulose, denominada cristalina. Porém a celulose não é uniforme, apresentando também uma região amorfa, com baixa organização (LORENCINI, 2013).

Figura 5 – Representação molecular da celulose

Fonte: Marabezi (2009).

As hemiceluloses estão associadas à celulose e à lignina e apresentam cadeias menores e ramificadas (MARABEZI, 2009). É um grupo de polímeros formado por diferentes unidades de hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e rabinose) (GUILHERME, 2014). Diferencia-se da celulose principalmente por sua estrutura totalmente amorfa e, portanto, menos resistente ao ataque de agentes químicos (RUEDA, 2010). No bagaço de cana-de-açúcar, as xilanas são os principais componentes.

A xilana é um polímero linear de unidades de xilose unidas por ligações do tipo β -(1,4). Essa cadeia principal pode estar ligada a moléculas de arabinose, ácido 4-*o*-metilglucurônico, ácido acético, ácido ferúlico, entre outros (RENNIE E SCHLLER, 2014).

A lignina é uma importante macromolécula rígida, estando atrás apenas da celulose em abundância. Possui uma estrutura complexa ainda não completamente esclarecida (NELSON e COX, 2014). É um componente não-carboidrato da biomassa lignocelulósica e possui derivados de grupos fenilpropanóides em estrutura condensada que lhe confere resistência à degradação (LORENCINI, 2013). É formado estruturalmente pela polimerização desidrogenativa de 3 moléculas felipropânicas: álcool cumarílico, álcool

coniferílico e álcool sinapílico (MARABEZI, 2009). Tem como objetivo principal dar suporte estrutural ao vegetal, garantir impermeabilidade e conferir resistência contra ataques microbianos e estresse oxidativo (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

2. 2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Dentre as possibilidades existentes de biocombustíveis, pode-se destacar o etanol. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, estando atrás apenas dos Estados Unidos da América. Enquanto nos EUA a matéria prima é o milho, no Brasil produz-se este álcool a partir da fermentação de caldo ou melaço de cana-de-açúcar (MAEDA, et al., 2013; FILOSO, et al. 2015; NEVES et al, 2016). De acordo com o levantamento realizado pela CONAB (2018), mesmo diante da redução na safra de cana-de-açúcar nos últimos anos, a melhoria na qualidade da mesma levou a um aumento de 1,4% na produção total de etanol, que chegará a 28,16 bilhões de litros na safra 2018/2019.

A produção em grande escala desse biocombustível no Brasil teve início no final da década de 70 com o lançamento do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), que tinha como objetivo a redução da dependência de combustíveis fósseis importados durante a crise mundial do petróleo (HOFSETZ e SILVA, 2012; FILOSO, et al. 2015).

A produção de etanol de primeira geração (1G), obtido a partir de sacaríneos e amiláceos, foi evoluindo e hoje há mercados comerciais maduros e tecnologias bem desenvolvidas. O etanol, além de resultar uma combustão mais limpa, apresentando uma vantagem ecológica em relação à gasolina, possui maior resistência à auto-detonação e maior massa específica, o que proporciona maior potência ao motor (MORO, 2015). Considerando-se essas vantagens e o fato do Brasil ser o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, este álcool é hoje uma das principais fontes de energia do país (RUEDA, 2010). O aproveitamento dos polissacarídeos presentes no bagaço de cana-de-açúcar, no entanto, corresponde a uma alternativa capaz de aumentar em até 50% a produção de etanol por hectare de cana plantado, sendo, portanto vantajoso o investimento em etanol de segunda geração (JUNQUEIRA, 2016; CANAONLINE, 2015).

A produção do etanol 2G está em expansão e acredita-se que em longo prazo se tornará economicamente viável em grande escala. Contudo, é necessário que haja melhoria no processo a fim de se aumentar a eficácia, isso porque o aproveitamento dos materiais lignocelulósicos é mais complicado devido à recalcitrância que estes apresentam em função de sua estrutura complexa. Assim, são necessárias etapas anteriores à fermentação e que permitam promover a desconstrução de sua estrutura para possibilitar aproveitamento de açúcares fermentescíveis (MAEDA, et al., 2013; ANDRADE et al., 2017).

Para produção do etanol 2G, o material lignocelulósico é submetido a etapas de pré-tratamento, hidrólise dos carboidratos e fermentação. A hidrólise da celulose produzirá glicose, que poderá ser convertida em etanol por leveduras tradicionalmente empregadas nos processos de produção de etanol 1G (particularmente *Saccharomyces cerevisiae*). A hidrólise da fração hemicelulósica produzirá uma mistura de açúcares rica em pentoses (sendo a xilose em maior quantidade) que podem ser convertidos em etanol por algumas leveduras com capacidade de fermentar açúcares C5 tais como a *Scheffersomyces stipitis* e *Scheffersomyces shehatae* (OGATA, 2013).

2. 3 PRÉ-TRATAMENTO DAS MATÉRIAS-PRIMAS LIGNOCELULÓSICAS

Para o caso da produção de etanol de segunda geração, a hidrólise dos componentes do material para a obtenção de solução rica em açúcares fermentescíveis é uma etapa limitante do processo. Atenção especial tem sido dada à hidrólise da celulose, considerando-se a já estabelecida tecnologia para fermentação de glicose a etanol. Proceder diretamente à hidrólise da celulose é possível por métodos como tratamento ácido. Esta opção, no entanto, requer condições extremas de temperatura e pressão, o que encarece o processo e resulta em problemas como degradação do produto e formação acentuada de compostos inibidores do metabolismo microbiano, diminuindo ou até mesmo inviabilizando o processo fermentativo subsequente (AUXENFANS et al., 2012). Assim, esforços de pesquisa têm sido feitos para a viabilização de uma etapa de pré-tratamento do material, a qual pode ser feita em condições comparativamente menos severas e torna sua estrutura mais susceptível a uma hidrólise da celulose

em condições brandas de pressão e temperatura por via enzimática (AGBOR et al., 2011; GALBE e ZACCHI, 2012).

A Figura 6 é uma representação esquemática do efeito dos pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos, mostrando a alteração estrutural que ocorre. Um pré-tratamento eficaz é capaz de maximizar o ataque enzimático e minimizar a formação de inibidores fermentativos. Além disso, não pode haver perda de carboidratos, devendo ter um custo reduzido, com baixo consumo energético e possibilidade de recuperação da lignina; assim, diante desses fatores, destacam-se os pré-tratamentos químicos que associam substâncias alcalinas ou ácidas à temperatura elevada (MOSIER, et al, 2005; MARTÍN et al. 2007).

Figura 6 – Representação esquemática do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos

Fonte: Adaptado de MOOD et al. (2013)

O tipo de biomassa que será utilizada é determinante na escolha do pré-tratamento, que poderá ser físico, químico, físico-químico e biológico. Cada tipo de pré-tratamento modificará a biomassa de forma diferente e, portanto, apresentará efeitos e rendimentos diversos (HENDRINKS e ZEEMAN, 2009; MORO, 2015;).

A Tabela 2 apresenta as características de alguns processos empregados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, enquanto o pré-tratamento

alcalino, o qual foi utilizado nesse trabalho, será apresentado de forma mais detalhada adiante.

Tabela 2 – Diferentes tipos de processos empregados na etapa de pré-tratamento

Pré-tratamentos Físicos	
Pré-tratamento	Característica
Moagem	Pré-tratamento mecânico que tem como objetivo a redução do tamanho das partículas e da cristalinidade. Uma vantagem é que o processo não produz inibidores, porém há um elevado gasto energético, o que o torna economicamente inviável para uso como opção única.
Micro-ondas	Processo de alta eficiência e de fácil operação em que se promove a interação direta entre um objeto e um aquecimento eletromagnético. Esse pré-tratamento age diretamente na estrutura da celulose, aumentando a sua susceptibilidade à ação enzimática em processos de tempo reduzido, o que representa uma vantagem do método.
Ultrassom	Processo de baixo impacto ambiental em que se tem redução do tamanho das partículas. Quando combinado com pré-tratamento com solventes orgânicos e líquidos iônicos, há uma melhora de rendimento.
Pré-tratamentos Físico-Químicos	
Explosão a vapor	Processo termoquímico em que o material é submetido a vapor com elevadas temperaturas e pressão. Esse tipo de pré-tratamento tem como objetivo tornar a celulose mais acessível para a hidrólise pela sua modificação estrutural e promoção da solubilização da hemicelulose, evitando-se a formação de elevadas concentrações de compostos inibidores.

Continua

Pré-tratamento		Características
Explosão com Amônia		Método alcalino térmico em que o material é submetido a elevadas temperatura e pressão na presença de amônia líquida, seguido por rápida descompressão. Há alteração estrutural do material, promovendo maior digestibilidade enzimática.
Água quente líquida		Tratamento térmico que tem como objetivo tornar a celulose mais acessível e apresenta como vantagem a baixa concentração de produtos solubilizados de hemicelulose e lignina, o que diminui o risco de produtos de degradação como o furfural e a condensação e precipitação de compostos de lignina, que são inibidores.
Explosão com CO ₂		Processo que ocorre de forma similar à explosão com amônia, porém com um aumento da taxa de hidrólise ocasionado pela utilização de CO ₂ e menor custo. Além disso, não produz inibidores.
Deslignificação oxidativa		Tratamento termoquímico em que ocorre a degradação da lignina em presença da enzima peroxidase e peróxido de hidrogênio.
Oxidação úmida		Processo no qual se promove a hidrólise de materiais lignocelulósicos na presença de oxigênio ou ar. É catalisado normalmente com carbonato de sódio e apresenta como vantagem a obtenção de açúcares sem a formação de inibidores como furfural e 5-hidroximetilfurfural. Porém, a alta pressão necessária para o processo eleva o custo do mesmo.
Pré-tratamentos Químicos		
Ozonólise		Processo que utiliza o ozônio como agente oxidante da lignina. Apresenta como vantagem o fato de utilizar temperatura e pressão ambientes, além de não gerar resíduos tóxicos; entretanto, a elevada quantidade de ozônio necessária para o processo eleva seu custo.

Continua

Pré-tratamento	Características
Organossolve	Processo que ocorre em presença de solventes orgânicos, geralmente em uma solução de ácido diluído, e promove simultaneamente a hidrólise e deslignificação do material.
Líquidos iônicos	São sais orgânicos compostos de cátions e ânions que são capazes de dissolver carboidratos e lignina simultaneamente. Esses compostos são recicláveis e reutilizáveis, porém possuem valor elevado, encarecendo o processo.
Ácido	Promove a hidrólise da hemicelulose a monossacarídeos e aumenta a acessibilidade enzimática à fração celulósica. A utilização de ácido diluído é mais vantajosa que a utilização de ácidos concentrados, pois embora estes possam ser aplicados sob temperaturas mais baixas, há um alto custo de manutenção ocasionados pela corrosão de equipamentos. Porém, é importante ressaltar que o pré-tratamento com ácido diluído também apresenta desvantagens, como o elevado consumo energético e degradação de açúcares em compostos como furfural e hidróxi-metil-furfural (HMF), além da formação de compostos aromáticos da lignina, os quais reduzem a eficiência ou a produtividade de processos fermentativos.
Alcalino	Processo que usualmente utiliza reagentes como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, amônia aquosa ou hidróxido de cálcio. Tem como vantagem o fato de poder ser conduzido em baixa temperatura e pressão, o que ocasiona menor formação de inibidores.

Continua

Pré-tratamento Biológico	
Pré-tratamento	Características
Tratamento biológico	Processo em que ocorre a modificação da composição química e estrutural dos materiais empregando microrganismos, os quais promovem a degradação da lignina e hemicelulose, tornando o material mais acessível à hidrólise enzimática. O baixo consumo de energia e as condições amenas do processo o tornam ecologicamente mais amigável, porém é um processo de baixa eficiência em que se tem uma perda considerável de carboidratos ao longo do tempo.
Conclusão	

Fonte: Hendriks e Zeeman (2009), Mood et al. (2013), Bhutto et al. (2017).

Independentemente do tipo de técnica de pré-tratamento, o objetivo sempre será tornar o material lignocelulósico passível de sacarificação com custo de processamento razoável e os resultados observados são diversos. A maior taxa de hidrólise enzimática e melhor rendimento de processo são obtidos através de efeitos como a diminuição do teor de lignina, o aumento da área de superfície ou a diminuição da cristalinidade (KIM et al., 2016).

Em um trabalho realizado por Siqueira et al. (2013), por exemplo, o pré-tratamento com clorito de sódio/ácido acético permitiu uma remoção de 60% de lignina e, com isso, 90% da celulose foi hidrolisada. Já em um trabalho realizado por Terán-Hilares et al. (2016a), no qual se utilizou um pré-tratamento alcalino em reator de coluna com solução de NaOH 0,3M, observou-se a remoção de 61% de lignina, sendo que cerca de 50% da fração celulósica e 57% da fração hemicelulósica foram hidrolisadas na etapa enzimática subsequente.

2. 3. 1 Pré-tratamento alcalino

A escolha do pré-tratamento é essencial para favorecer elevados rendimentos nas etapas biológicas subsequentes (sacarificação e fermentação) e, dentre os métodos descritos, o pré-tratamento utilizando soluções alcalinas apresenta vantagens como menor corrosividade dos equipamentos, quando comparado aos métodos ácidos, e possibilidade de operação sob condições mais brandas de processo (MODENBACH e NOKES, 2012).

Esses tratamentos são realizados, comumente, com soluções de NaOH, Ca(OH)_2 ou amônia, e podem aumentar de forma eficiente a digestibilidade enzimática da celulose (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). São operados sob ampla faixa de condições, com temperaturas variando de ambiente a 150°C (WU et al., 2011, MODENBACH e NOKES, 2012,).

O emprego desse tipo de pré-tratamento pode resultar em hidrólise parcial da fração hemicelulósica ou sua liberação no meio na forma macromolecular, sendo que as ligações entre a lignina e o carboidrato são quebradas e parte da lignina é solubilizada (JORGENSEN et al., 2007; GALBE e ZACCHI, 2012; MODENBACH e NOKES, 2012). Além disso, há um aumento da área superficial do material pelo intumescimento das partículas, aumentando a acessibilidade dos carboidratos pelas enzimas e reduzindo o grau de polimerização e cristalinidade da fração celulósica (MODENBACH e NOKES, 2012).

Outro aspecto importante do pré-tratamento alcalino é que os reagentes utilizados podem ser reutilizados em alguns métodos (KIM et al. 2016). Em um estudo realizado por Terán-Hilares et al. (2016a), em que o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado com solução de NaOH (0,3 M), a solução alcalina que foi usada no pré-tratamento foi reutilizada em três bateladas sucessivas e confirmou a possibilidade de reutilização. Neste trabalho, na primeira batelada, a digestibilidade da celulose e hemicelulose foram de 49,2% e 57%, respectivamente, e, ao reutilizar o licor para novo pré-tratamento, a digestibilidade foi de 47,3% para celulose e 55,1% para hemicelulose.

Uma desvantagem importante de pré-tratamento alcalinos é a necessidade de uso de grande quantidade de reagente por massa de bagaço pré-tratada (TERÁN-HILARES et al., 2018b). Mesmo com reuso do álcali, seu consumo no processo pode ser elevado, o que encarece o pré-tratamento. Uma alternativa

recentemente desenvolvida e que pode reduzir o consumo de reagentes refere-se ao uso de métodos alcalinos assistidos por cavitação hidrodinâmica (TERÁN-HILARES et al. 2016b).

2. 3. 2 Pré-tratamento assistido por Cavitação Hidrodinâmica

A cavitação, que pode ser acústica ou hidrodinâmica, é a formação, crescimento e rápido colapso de bolhas cheias de gás ou vapor (MADISON et al., 2017). A cavitação hidrodinâmica (CH) corresponde ao fenômeno gerado pelo movimento de fluido que sofre uma redução de pressão ocasionada pela mudança repentina na velocidade (MADISON et al., 2017). Devido a sua facilidade de operação, tem sido recentemente aplicada no pré-tratamento da biomassa (KIM et al., 2015, TERÁN-HILARES et al. 2016b, TERÁN-HILARES et al. 2017a).

Os efeitos mecânicos, como a redução do grau de polimerização da celulose da biomassa lignocelulósica e o aumento da área superficial específica, são intensificados ao se aplicar a cavitação hidrodinâmica, devido à elevada turbulência e as condições de elevado cisalhamento (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Esse método induz a transformações químicas e físicas no material. Os efeitos químicos se devem à decomposição da água, por altas temperaturas locais, que gera radicais hidroxila (BADVE et al. 2014; LI et al., 2015). Além disso, a geração de ondas de choque ao longo do processo causa pirólise/decomposição de moléculas orgânicas nas proximidades das cavidades (BADVE et al. 2014; TERÁN-HILARES et al., 2016b).

Diante da alta eficiência energética e das vantagens apresentadas pelo método, a utilização da cavitação hidrodinâmica tem se mostrado como um ótimo recurso quando se deseja otimizar o pré-tratamento e, conseqüentemente, a produção de etanol, como é o caso da presente pesquisa.

2. 4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O pré-tratamento da biomassa é seguido da etapa biológica de sacarificação (hidrólise enzimática), que tem como finalidade quebrar a cadeia polissacarídica em açúcares fermentescíveis.

O sucesso dessa etapa depende de fatores relacionados às enzimas escolhidas e as características físicas, químicas e morfológicas, dos substratos utilizados (SUN et al., 2016). Em relação às enzimas, os fatores importantes envolvem a melhoria da atividade enzimática, que inclui inibição do produto final, estabilidade térmica, sinergismo e adsorção (ZHAO et al., 2009).

Alvira et al. (2010) mencionam os seguintes fatores relacionados ao substrato:

- Cristalinidade da celulose;
- Grau de polimerização da celulose;
- Área de superfície disponível do substrato (volume de poros);
- Barreira de lignina (conteúdo e distribuição);
- Teor de hemicelulose;
- Tamanho de partícula de matéria-prima;
- Porosidade;
- Espessura da parede celular (grossura);

A hidrólise enzimática da celulose é altamente específica e ocorre em condições relativamente suaves de temperatura, pressão e pH, o que torna esse processo mais vantajoso em aspectos energéticos e ambientais em comparação aos métodos químicos (MOUTTA et al., 2014). Além disso, apresenta elevada produção de açúcares fermentescíveis, mínima formação de produtos secundários e baixa corrosividade de equipamentos (SUN e CHENG, 2002; MOSIER et al., 2005 SARKAR, et al. 2012).

A hidrólise enzimática é realizada por enzimas do complexo celulolítico, majoritariamente da classe de hidrolases, sendo capazes de romper as ligações glicosídicas e classificadas de acordo com o seu local de atuação no substrato celulósico. Desta forma, são classificadas em: endoglucanases (EnG), que agem de forma aleatória, clivando a ligação beta do interior da molécula de celulose,

preferencialmente nas regiões amorfas; exoglucanases (ExG), ou também celobioidrolases (CBH), que atuam nas extremidades da cadeia da celulose, em regiões cristalinas, liberando maior quantidade de celobiose como produto, sendo distinguidos dois tipos, diferenciados pelo local de atuação - CBHI e CBHII, atuando nas extremidades redutoras e não redutoras, respectivamente; e β -glucosidases (BG), que catalisam a clivagem da celobiose em glicose, disponibilizando os açúcares monoméricos para a etapa de fermentação (LYND et al., 2002; CASTRO e PEREIRA, 2010).

Outra característica deste processo é a atuação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico (Figura 7). Sabe-se que, quando ocorre ação conjunta das enzimas, há um rendimento melhor que a soma dos rendimentos individuais, sendo conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulasas (LYND et al., 2002; VANHOLME et al., 2013):

- ✓ Sinergia EnG-ExG: atuação das endoglucanases nas regiões amorfas e liberação dos terminais redutores e não redutores, nos quais atuarão as celobiohidrolases (CBH) do tipo I e do tipo II, respectivamente;
- ✓ Sinergia ExG-ExG: as CBHs I e CBHs II atuam simultaneamente nos terminais redutores e não redutores, havendo a liberação de celobiose;
- ✓ Sinergia ExG-BG e EnG-BG: as celobioidrolases atuam liberando celobiose e oligossacarídeos, substrato da β -glucosidase que libera glicose.

Figura 7 – Atuação conjunta das enzimas do complexo celulolítico

EG: Endoglucanases; CBH: celobiohidrolases; BG: β -glucosidases;
CDH: celobiose desidrogenase; GH61: Glicosil hidrolase família 61

Fonte: Vanholme et al. (2013)

Para aumentar o rendimento global de bioetanol, é essencial que haja a conversão da fração hemicelulósica e, como esta fração do material apresenta uma estrutura variada, há necessidade de um grande conjunto de enzimas essenciais para a hidrólise efetiva (VAN DYK e PLETSCHE, 2012). Muitas vezes, quando há a opção por pré-tratamentos que não hidrolisam extensivamente a hemicelulose, esta será hidrolisada na etapa enzimática, principalmente considerando que os complexos celulolíticos comerciais possuem hemicelulases em sua composição.

As hemicelulases são divididas em dois grupos: as enzimas centrais, que despolimerizam o esqueleto da molécula como, por exemplo, endo- β -1,4-xilanases, 1,4- β -xilosidases de xilana, e as enzimas auxiliares, que retiram substituintes e como exemplos têm-se α -L-arabinofuranosidase, β -glucuronidase acetilxilanesterase e esterase do ácido ferúlico (BHATTACHARYA et al. 2015).

2. 5 FERMENTAÇÃO

As etapas de pré-tratamento e hidrólise são planejadas visando à otimização da fermentação que, em condições adequadas (temperatura, substrato, aeração e micro-organismo), converterá os açúcares presentes em etanol ou outros produtos (LIMAYEM e RICKE, 2012). Durante o processo de fermentação, os micro-organismos (bactérias e leveduras) metabolizam monossacarídeos, como glicose e frutose, e dissacarídeos, como maltose e sacarose (ZABED et al. 2017)

O micro-organismo utilizado é um dos principais parâmetros de eficiência da etapa de fermentação e, nesse aspecto, é preciso analisar parâmetros inerentes a eles tais como temperatura ideal, faixa de pH, taxa de crescimento, entre outros. Além disso, é necessário analisar que tipo de substrato ele é capaz de metabolizar, pois, dependendo do tipo de pré-tratamento utilizado, o hidrolisado conterá, além de glicose, outros monossacarídeos como a xilose (BALAT, 2011).

A utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo fermentativo é uma das práticas biotecnológicas mais antigas e, atualmente, é amplamente utilizada para produção de etanol combustível a partir de uma grande

variedade de biomassas. Essa ampla utilização deve-se a características como elevada eficiência na conversão de açúcares em álcool e sua tolerância à alta concentração de etanol (ZABED et al., 2017). Na Figura 8 é apresentada a via metabólica de fermentação de hexoses pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A conversão de glicose em etanol pela via glicolítica apresenta um rendimento teórico de 0,51 g de etanol por grama de glicose, sendo uma molécula de glicose convertida em 2 moléculas de etanol e 2 moléculas de gás carbônico (BAI et al., 2008; ANTUNES, 2015).

O processo de fermentação de material lignocelulósico tem sua viabilidade econômica favorecida quanto tanto as hexoses quanto as pentoses são convertidas a etanol, já que a hemicelulose, usualmente rica em xilana e que produzirá em sua hidrólise xilose, é o segundo polissacarídeo mais abundante. Porém, essa capacidade de fermentar pentoses não é comum entre os microrganismos (KUHAD et al., 2011).

Figura 8 – Via metabólica de produção de etanol via fermentação de hexoses em *Saccharomyces cerevisiae*

HK: hexoquinase, PGI: fosfoglucoisomerase, PFK: fosfofrutoquinase, FBPA: frutose bisfosfato aldolase, TPI: triose fosfato isomerase, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, PGK: fosfoglicerato cinase, PGM: fosfoglicereutase, ENO: enolase, PYK: piruvato quinase, PDC: piruvato descarboxilase, ADH: álcool desidrogenase.

Fonte: Adaptado de Bai et al. (2008)

Sabe-se que micro-organismos tradicionalmente utilizados para produção de bioetanol como *Saccharomyces cerevisiae* possuem alta eficiência na fermentação de hexoses, mas são incapazes de fermentar pentoses (BALAT, 2011). Uma alternativa é o uso de micro-organismos geneticamente modificados (Matsushika et al., 2009; Kobayashi et al., 2017); porém, existem leveduras capazes de fermentar pentoses naturalmente, entre elas *Scheffersomyces stipitis* e *Scheffersomyces shehatae* (CARRASCO et al., 2013).

Para essas leveduras fermentadoras de pentose, a via metabólica inicia-se com a redução da D-xilose a xilitol pela ação da enzima D-xilose redutase e, em seguida, o xilitol é oxidado para formar a D- Xilulose pela xilitol desidrogenase. A oxidação da D-xilulose a D-xilulose-5-fosfato é seguida pela metabolização desta pela via das pentoses fosfato (PPP), na qual os rearranjos não oxidativos da α -xilose-5-fosfato pela ribulosefosfato-3-epimerase, transaldolase (TAL) e transcetolase (TK) resultam na formação de gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato, que podem ser convertidos em etanol por reações fermentativas da via Embden – Meyerhoff – Parnas (EMP) (KUHAD et al., 2011).

Na Figura 9 é apresentado um esquema representando a via metabólica para produção de etanol a partir de xilose.

A conversão de xilose a etanol exige a presença de nutrientes como extrato de leveduras, peptona e sulfato de amônio, que são fontes de nitrogênio e essenciais para a síntese de aminoácidos, vitaminas, purinas, pirimidinas e ácidos nucleicos (ANTUNES, 2015). Além disso, Medina (2013) menciona que essa conversão é um processo complexo e depende de fatores como temperatura, pH inicial, aeração, agitação, concentração inicial de açúcares, concentração inicial de células entre outros.

Figura 9 – Via metabólica para conversão de xilose a etanol

A: Xilose redutase; B: xilitol desidrogenase; C: xilulocinase; D: fosfoquetolase; E: transaldolase; F: transcetolase; G: piruvato descarboxilase; H: acetaldeído desidrogenase e I: xilose isomerase.

Fonte: Adaptado de Kuhad et al.(2011)

A levedura *Scheffersomyces shehatae* (anteriormente chamada de *Candida shehatae*) foi escolhida para esta pesquisa com base nos resultados promissores na obtenção de etanol. A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos realizados Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena-Universidade de São Paulo (EEL-USP) com essa levedura para obtenção de etanol.

Tabela 3 – Pesquisas realizadas com a levedura *Scheffersomyces shehatae* para produção de etanol no Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena-Universidade de São Paulo (EEL-USP)

Referência	Resultados principais
Medina (2013)	Rendimento de etanol ($Y_{p/s}$) de 0,44 g/g e produtividade (Q_p) de 0,25 g.L ⁻¹ .h ⁻¹
Chandel et al. (2014)	Produção de etanol com o rendimento de 0,38 g/g.
Antunes et al. (2014)	Rendimento de 0,38 g/g de etanol e 0,19 g.L ⁻¹ .h ⁻¹ de produtividade volumétrica.
Antunes et al. (2016)	Rendimento de etanol ($Y_{p/s}$) 0,31 g/g e produtividade de etanol (Q_p) de 0,12 g.L ⁻¹ .h ⁻¹ .
Dussán et al. (2016)	Rendimento de 0,42 g/g de etanol, produtividade de etanol de 0,25 g.L ⁻¹ .h ⁻¹ e a eficiência do processo de 85%.
Antunes et al. (2017)	Rendimento de etanol de 0,26 g/g e produtividade de 0,17 g.L ⁻¹ .h ⁻¹ .

Fonte: Arquivo pessoal

Conforme mostrado na Tabela 3, fatores de rendimento entre 0,26 g/g e 0,44 g/g e produtividades volumétricas entre 0,12 g.L⁻¹.h⁻¹ e 0,25 g.L⁻¹.h⁻¹ têm sido obtidas empregando esta levedura em diferentes configurações de processo. No trabalho de Dussán et al. (2016), por exemplo, os autores empregaram o hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar para realização de fermentação a 30°C por 72 h e avaliaram que o rendimento máximo, apresentado na Tabela 3, ocorreu sob condições limitadas de oxigênio, pH inicial de 6,5 e 100 RPM. Em um trabalho mais recente, Antunes et al. (2017), empregando células imobilizadas de *S. shehate* para obtenção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado, demonstrando que essa configuração de sistema é propícia para a produção de etanol 2G.

2. 6 DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DE PROCESSOS FERMENTATIVOS

Na produção de etanol de segunda geração, a etapa de hidrólise enzimática da celulose pode ser operada de forma isolada ou em conjunto com a fermentação, empregando-se diferentes configurações, visando a um maior rendimento em etanol (ASK et al., 2012). Têm-se quatro principais configurações de processo (Figura 10): hidrólise e fermentação em separado (*Separate Hydrolysis and Fermentation* - SHF), na qual a produção de enzimas, hidrólise e fermentação são realizadas separadamente e de forma não integrada; sacarificação e fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and fermentation* - SSF), em que a produção de enzimas ocorre de forma separada e as etapas seguintes de sacarificação e fermentação são realizadas de forma simultânea e integradas; sacarificação e co-fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Co-fermentation* - SSCF), a qual é similar ao processo de SSF, tendo como diferencial a fermentação concomitante de hexoses e pentoses; e o bioprocesso consolidado (*Consolidated bioprocessing* - CBP) em que todas as etapas (produção de enzimas, sacarificação e fermentação) ocorrem de forma simultânea e interligada (VAN ZYL et al., 2011).

Figura 10 – Diferentes configurações de processo para obtenção de etanol 2G

Fonte: Adaptado de Devarapalli e Atiyeh (2015)

Estudos recentes mostraram resultados variáveis de SHF e SSF em termos de rendimento em etanol, dependendo das condições operacionais, micro-organismo e biomassa utilizada. A configuração mais comum é a SHF, na qual o material lignocelulósico é submetido ao pré-tratamento e, posteriormente, a solução resultante, rica em glicose, é levada para outro tanque onde irá ocorrer a fermentação, permitindo que cada etapa do processo seja executada em condições ótimas com o micro-organismo e as enzimas sendo usados em temperatura e pH ótimos independentes (hidrólise $T=50^{\circ}\text{C}$ e fermentação $T=30^{\circ}\text{C}$, por ex.) (ASK et al., 2012; ISHOLA et al. 2013).

As configurações SSF/SSCF apresentam vantagens sobre o processo SHF por apresentarem um menor tempo de processamento, sendo que as complexidades de processo são minimizadas e precisa-se de um menor investimento de capital (SILVA e CHANDELL 2014). Hasunuma e Kondo (2012) relatam que a configuração SSF envolve menos equipamentos e, com isso, há uma redução do custo de investimento. Outro aspecto relevante das configurações com etapas simultâneas e integradas (SSF e SSCF) é que os açúcares liberados a partir da hidrólise são consumidos rapidamente pelos micro-organismos, minimizando a inibição das enzimas celulolíticas por produtos de hidrólise (VAN ZYL et al., 2011; ASK et al., 2012). De fato, a inibição da hidrólise enzimática por celobiose e glicose tem sido relatada e, assim, a conversão da glicose a etanol no mesmo processo impedirá o acúmulo destes açúcares, favorecendo a reação enzimática. Bons resultados têm sido relatados na literatura. Ohgren et al. (2007), por exemplo, relataram um aumento do rendimento de etanol em 13% no processo SSF, comparado ao SHF, empregando palha de milho como matéria-prima.

Uma desvantagem destas configurações é que as condições para a hidrólise enzimática e fermentação costumeiramente são as mesmas, porém não são as condições ótimas para ambos os processos. Alguns trabalhos, no entanto, avaliaram alternativas para SSF em vasos separados interconectados com membranas (Viola et al., 2013; Ishola et al., 2013), sendo que Terán-Hilares et al. (2017b) investigou a produção de etanol em processo SSCF em reatores de coluna interconectados sem uso de membranas, obtendo 0,48 g de etanol/g de glicose e xilose consumidas. Neste trabalho, os autores empregaram colunas independentes para a hidrólise e a fermentação, sendo que estas puderam então

ser realizadas em suas condições ótimas de temperatura. O bagaço de cana-de-açúcar constituía um leito fixo no qual solução de enzimas era percolado, e os reatores de hidrólise e fermentação eram conectados, recirculando-se meio líquido entre eles. Na coluna de fermentação, havia células imobilizadas em gel de alginato de cálcio e o sistema era aerado.

Pesquisas também demonstram que o processo de SSCF, que foi utilizado nessa pesquisa, é promissor para produção de etanol. Ojeda et al. (2011), em uma comparação de sistemas SHF, SSF e SSCF na produção de bioetanol, avaliaram a exergia do processo e observaram que, dentre eles, o sistema SSCF foi o que apresentou melhores resultados. Em um trabalho realizado com capim (*Pennisetum purpureum* Schumach) utilizando-se a configuração SSCF para produção de etanol, Yasuda et al. (2014) obtiveram 74% de rendimento teórico após 96h. Comparando-se o processo de SHF e SSCF, Jin et al. (2012) verificaram que na primeira configuração houve a produção de $0,13 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de etanol, enquanto que no processo SSCF a produção foi de $0,23 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, demonstrando assim que esse tipo de configuração pode resultar em maior produtividade.

2. 7 BIORREATORES DE COLUNA E O USO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS

Algumas opções de biorreatores têm sido relatadas tanto para a etapa de hidrólise enzimática quanto para a etapa de fermentação no processo de produção de etanol 2G (MILESSI, 2012), sendo que, entre as diversas variáveis a serem consideradas, o teor de sólidos carregado no sistema de hidrólise enzimática é uma das mais importantes. Normalmente, utilizam-se reatores com baixo carregamento de sólidos ($\leq 5\%$ de sólidos, m/m). No entanto, considerando-se a necessidade de melhorar eficiência do processo, o uso de maiores teores de sólidos possibilita a obtenção de maior concentração de açúcares fermentescíveis no meio (BORREGA e SIXTA, 2015). Neste sentido, o grupo do Laboratório de Biopolímeros, Biorreatores e Simulação de Processos (LBBSIM)/EEL-USP relatou o uso de reatores de coluna com leito fixo percolado ("*packed bed flow-through column reactor*") para o pré-tratamento e hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar visando à produção de etanol. Este relato foi publicado por Terán-

Hilares et al. (2016a), tendo os autores empregado 13,2% de sólidos no reator e observado que cerca de 30 g/L de glicose e 10 g/L de xilose foram liberados do material pré-tratado em cerca de 24h de processo de hidrólise enzimática.

Na realização desta pesquisa utilizaram-se os reatores de colunas interligadas para a realização do processo de SSCF, como no trabalho realizado por Terán-Hilares et al. (2017b). Na coluna em que se realizou a hidrólise utilizou-se leito fixo ou empacotado. De fato este tipo de leito tem sido tradicionalmente usado para a maioria dos reatores catalíticos em larga escala, devido a sua alta eficiência, baixo custo, facilidade de construção, operação, ampliação de escala, controle automático e menor força de cisalhamento (AL-ZUHAIR et al., 2011; FERNANDES, 2010; POPPE et al., 2015), embora algumas desvantagens para estes sistemas possam ser citadas, como a facilidade de obstrução do leito, aparecimento de caminhos preferenciais e fluxos de calor e massa ineficientes (ZANIN e MORAES, 2004).

Para a coluna de fermentação utilizou-se reator de coluna de bolhas. Este reator permite altas taxas de transferência de calor e massa, apresentando vantagens operacionais e de manutenção (KANTARCI et al., 2005).

A seleção do reator também é vinculada ao uso de enzimas e células em sua forma livre ou imobilizada. Sistemas com células imobilizadas apresentam diversas vantagens em comparação ao uso de células livres, incluindo (1) proteção aos efeitos ambientais (compostos tóxicos e pH), (2) capacidade de reutilização (reciclo de células), (3) facilidade de separação e recuperação de produtos na fase “downstream” e (4) menor susceptibilidade de contaminação por outros micro-organismos (ANTUNES et al., 2016; TAKEI et al., 2011). Há algumas limitações, como transporte do substrato, transferência de oxigênio e um possível rompimento da matriz devido ao crescimento celular. Porém, estas podem ser contornadas com o tipo método e suporte de imobilização empregado e o tipo de biorreator (COVIZZI et al., 2007).

Os processos biotecnológicos podem ser favorecidos pelas técnicas de imobilização celular que são classificadas da seguinte forma: (a) fixação a uma superfície sólida; (b) aprisionamento dentro de uma matriz porosa; (c) agregação de celular (floculação) e (d) contenção de células atrás de barreiras (KOURKOUTAS et al., 2004; GENISHEVA et al. 2014).

A Tabela 4 as características das técnicas de imobilização utilizadas. Além do tipo de imobilização, são diversos os suportes empregados, podendo ser, por exemplo, polímeros (naturais, sintéticos) ou materiais inorgânicos, empregados individualmente ou combinados, dependendo da finalidade do processo (Tabela 5).

Tabela 4 – Principais técnicas de imobilização celular utilizadas

Técnica	Características
Fixação a superfícies sólidas	A ligação a uma superfície é realizada por adsorção natural ou através de forças eletrostáticas ou ligação covalente entre a membrana celular e o agente de ligação. Método que de fácil realização.
Aprisionamento dentro de uma matriz porosa	As células podem ser introduzidas em um material poroso e, após o crescimento, sua mobilidade é restrita pela presença de outras células e pela matriz ou pode-se sintetizar uma matriz <i>in situ</i> ao redor das células. O método tem como objetivo principal a inclusão de células dentro de uma rede rígida para dificultar que estas migrem para o meio circundante, mas que permita a transferência em massa de nutrientes e metabólitos.
Floculação Celular (Agregação)	Pode ser realizado por agregação de células que formam uma unidade maior ou através da propriedade de células em suspensões de aderirem rapidamente a aglomerados e sedimentos.
Contenção mecânica atrás de uma barreira	Realizada através de filtros de membrana microporosa ou por aprisionamento de células em uma microcápsula ou por imobilização celular em uma superfície de interação de dois líquidos imiscíveis. A possível bioincrustação de membrana causada pelo crescimento celular é uma desvantagem da técnica.

Fonte: Kourkoutas et al., 2004; Genisheva et al. 2014

Tabela 5 – Suportes utilizados para imobilização celular.

Polímeros Naturais	Polímeros Sintéticos	Materiais Inorgânicos
Alginato	Poliacrilamida	Alumina
K – carregenana	Cloreto de polivinila	Sílica
Ágar	Poliestireno	Zircônia
Pectina	Poliuretano	Vidro
Celulose	Polietileno glicol	Diatomita
Dextrana		Vermiculita
Colágeno		

Fonte: Adaptado de Pradella, (2001) e Es et al. (2015)

Santos et al. (2018) mencionam que a imobilização de micro-organismos é um passo crucial para alcançar melhores resultados de processos fermentativos e, dentre as diversas técnicas existentes, a imobilização com alginato de cálcio se destaca, pois apresenta boa biocompatibilidade, baixo custo, disponibilidade e facilidade de preparo.

Nikolic et al. (2009) apresentaram um trabalho em que se produziu etanol a partir de farinha de milho com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em esferas de alginato, e observaram que o suporte foi eficiente, promovendo maior tolerância ao meio com alta concentração de etanol.

Outros micro-organismos também têm sido avaliados para a produção de etanol com células imobilizadas. Wirawan et al. (2012) produziram etanol celulósico em duas configurações de processo (SHF e SSF) com *Zymomonas mobilis* imobilizadas tanto em alginato de cálcio quanto em PVA, mostrando a relação das configurações de processos com a imobilização. Em um trabalho mais recente realizado na EEL-USP, Antunes et al. (2016) empregaram *Scheffersomyces shehatae* imobilizada em gel de alginato de cálcio para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar. Os autores obtiveram um fator de rendimento de substrato em etanol de 0,31 g/g a partir de xilose, demonstrando o potencial da levedura para o aproveitamento da fração hemicelulósica do bagaço em biorrefinarias.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi contribuir para o desenvolvimento de biorrefinarias de cana-de-açúcar, avaliando-se o uso de reatores de colunas interligadas na produção de etanol em processos de sacarificação e cofermentação simultâneas (SSCF).

Como objetivos específicos, teve-se:

- ✓ Avaliação da hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar em reator de coluna com leito fixo em processo SSCF, empregando-se bagaço pré-tratado por processo alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica.
- ✓ Avaliação da produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar em processo SSCF, empregando reatores de coluna interligados e utilizando células de *Scheffersomyces shehatae* imobilizadas em gel de alginato de cálcio.
- ✓ Definição, por meio de metodologia de planejamento de experimentos, das condições de processo de produção de etanol utilizando células imobilizadas em reator de colunas interligadas em processo SSCF, avaliando a influência dos parâmetros vazão de recirculação e carga enzimática.

4 METODOLOGIA

4. 1 MATÉRIA-PRIMA E CARACTERIZAÇÃO

O bagaço de cana-de-açúcar empregado nos experimentos foi fornecido pela Usina Vale Onda Verde, localizada no município de Onda Verde/SP.

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram secas e em seguida trituradas em moinho de martelo, procedendo-se à análise granulométrica em peneiras padrão série Tyler.

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

4. 2 PRÉ-TRATAMENTO

4. 2. 1 Pré - tratamento alcalino

Para a realização do pré-tratamento utilizou-se a fração de bagaço que ficou retida em peneiras de 28 Mesh. O pré-tratamento foi efetuado em biorreator de coluna com diâmetro interno de 40 mm e volume de 900 mL, baseando-se no trabalho de Terán-Hilares et al. (2016a). O interior desta coluna foi preenchido com o leito, composto por aproximadamente 80 g de bagaço (massa seca) de bagaço *in natura*. Fez-se a recirculação do meio reacional composto por 500 mL solução aquosa de NaOH, na razão mássica NaOH:bagaço (massa seca) de 0,27. A recirculação foi auxiliada por bomba peristáltica, sendo a vazão de 0,556 mL/s.

O pré-tratamento foi realizado por 4h a uma temperatura de 90°C. Após esse período o bagaço pré-tratado foi lavado no mesmo reator com água destilada até que esta atingisse um pH de 7.

O bagaço pré-tratado foi então caracterizado em relação aos seus componentes principais (celulose, hemicelulose e lignina).

4. 2. 2 Pré- tratamento alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica

Para os sistemas SSCF realizou-se um pré-tratamento alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica baseando-se no processo experimental descrito por Terán-Hilares et al. (2017a). Foi utilizado um reator de cavitação com um volume total de 3 L, o qual tinha seus tanques principais encamisados para controle de temperatura através de recirculação de água a partir de um banho termostatzado. A Figura 11 apresenta um esquema do sistema de cavitação hidrodinâmica utilizado nessa pesquisa.

Figura 11 – Representação esquemática do sistema de cavitação hidrodinâmica usado para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Fonte: Adaptado de Terán-Hilares et al. (2017a)

Para a realização do pré-tratamento utilizou-se a fração de bagaço moído que ficou retida em peneiras de 28 Mesh.

A solução alcalina contendo hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio 50% foi constantemente recirculada no sistema a 75°C por 10 min, com uma vazão de recirculação de 5 m³/h. O bagaço de cana-de-açúcar foi mantido dentro de uma malha cilíndrica e colocado na zona de cavitação. A cavitação foi gerada pela queda de pressão de 3 bar para 0,3 bar no fluido que fluía através da placa de orifício (16 orifícios com 1 mm de diâmetros). Após o pré-tratamento, todas as amostras de bagaço foram lavadas, secas e finalmente caracterizadas quanto a seus principais constituintes (celulose, hemicelulose e lignina).

4. 3 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE EM FRASCOS ERLLENMEYER

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL, preparou-se um meio reacional composto por tampão citrato 50 mM pH 4,8, bagaço pré-tratado em uma concentração 2% m/m e uma preparação comercial de celulase de *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) com atividade enzimática inicial de 80 FPU. Foram empregadas diferentes quantidades de enzima por massa seca de bagaço, mais especificamente 10 FPU/g, 15 FPU/g e 20 FPU/g, sendo o volume total de meio reacional de 15 mL.

Os frascos permaneceram em incubadora por 48h a 150 rpm e 50°C e, após esse período, retirou-se amostra do meio para análise da concentração açúcares por HPLC.

4. 4 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM REATOR DE COLUNA COM LEITO FIXO PERCOLADO

O processo de hidrólise enzimática das frações carboidrato do bagaço foi avaliado em biorreator de coluna com diâmetro interno de 30 mm e volume 160 mL, conforme esquema simplificado apresentado na Figura 12. A coluna principal, construída em vidro, apresentava uma camisa para controle de temperatura. O interior desta coluna principal foi preenchido com o leito, composto de aproximadamente 35 g (massa seca) de material pré-tratado. A recirculação de 290 mL de meio reacional foi realizada com o auxílio de bomba peristáltica, em uma vazão 30 mL/min. Utilizou-se a preparação comercial de celulase *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e suplementou-se o meio com um complexo de hemicelulases e celulases rico em β -glucosidase NS50012 (Novozymes Latin America Ltda., Araucária, PR, Brasil), com atividade de β -glucosidase de 69,57 UI/mL. Para a realização da hidrólise utilizou-se 15 FPU/g de bagaço da preparação de celulase e 20 UI/g de bagaço do complexo NS50012.

O meio reacional era composto por tampão citrato 50 mM pH 4,8, e o reator foi operado a 50°C por 24 horas, sendo retiradas amostras periódicas do meio

para análise do teor de açúcares por HPLC. O material pré-tratado foi carregado no reator e o sistema operou como um leito fixo percolado (TERÁN-HILARES et al., 2016a).

Figura 12 – Esquema simplificado do reator empregado no projeto para hidrólise enzimática dos polissacarídeos de bagaço de cana-de-açúcar

Fonte: Arquivo pessoal

4. 5 AVALIAÇÃO DE SISTEMAS SSCF COM COLUNAS INTERLIGADAS

4. 5. 1 Microrganismo e encapsulamento

Para a realização dos processos SSCF, utilizaram-se células de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 disponíveis no Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos Aplicados (GMBio) da Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo, Brasil.

O meio para o preparo do inóculo foi composto por: glicose 30 g/L, peptona 20 g/L e extrato de levedura 10g/L. O crescimento do inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 50 mL de meio em um agitador rotativo Innova® 44 / 44R (New Brunswick Scientific Co., Inc., EUA) a 30°C, 220 rpm por 48 h. Após esse tempo, as células foram centrifugadas e lavadas com água destilada e a levedura recuperada foi misturada com solução de alginato de sódio (1%) previamente esterilizada.

A imobilização foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Antunes et al. (2016), gotejando a solução contendo células em solução esterilizada de cloreto de cálcio (0,2 mol/L) utilizando uma bomba peristáltica ALITEA-XV (Bioengineering AG –Wald, Suíça). As células imobilizadas foram utilizadas no processo SSCF.

4. 5. 2 Produção de etanol no processo SSCF

A Figura 13 mostra um esquema representativo do sistema SSCF utilizado nessa pesquisa, na qual foi montado um sistema com duas colunas interligadas, sendo a primeira utilizada para hidrólise enzimática e a segunda coluna operada para obtenção de etanol por fermentação empregando células de *S. shehatae* imobilizadas em gel de alginato de cálcio. A movimentação de líquido entre as colunas foi realizada por bomba peristáltica.

As células imobilizadas compuseram o leito da coluna de fermentação, sendo 70 mL de biocatalisador imobilizado com uma concentração celular por volume de alginato de 6,75 g/mL, enquanto que o bagaço pré-tratado compôs o leito da coluna de hidrólise enzimática, com a massa correspondendo a 12% de teor inicial de sólidos no sistema, no qual o volume total foi de 300 mL. O meio reacional que recirculou no sistema de colunas interligadas foi composto por solução aquosa contendo mistura comercial de enzimas Cellic® CTec2 (Novozymes Latin America Ltda., Araucária-PR, Brasil) enriquecida com 5 g/L de sulfato de amônio, 3 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de extrato de malte, estes 3 últimos componentes empregados como nutrientes para as células, em concentrações conforme Antunes et al. (2016). A coluna de fermentação foi mantida a 30°C e a coluna de hidrólise enzimática a 50°C. O reator de fermentação foi continuamente alimentado por ar em uma vazão de 0,25 vvm.

O planejamento estatístico foi utilizado como ferramenta de análise e otimização, a fim de se avaliar a influência da vazão de recirculação de meio entre as colunas e da carga enzimática no despenho do processo. As condições avaliadas empregando planejamento estatístico são apresentadas na Tabela 6.

Figura 13 – Esquema simplificado do sistema de colunas interligadas

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 6 – Planilha de experimentos conforme planejamento estatístico realizado para avaliação da influência das variáveis vazão de recirculação e carga enzimática na produção de etanol em processo SSCF empregando células de *S. shehatae* imobilizadas em gel de alginato de cálcio (valores codificados entre parênteses)

Experimento	Vazão de recirculação (mL/min)	Carga enzimática (FPU/g)
1	14 (-1)	5 (-1)
2	35 (+1)	5 (-1)
3	14 (-1)	15 (+1)
4	35 (+1)	15 (+1)
5	24 (0)	10 (0)
6	24 (0)	10 (0)
7	24 (0)	10 (0)

Fonte: Arquivo pessoal

Após 72h a coluna de hidrólise foi retirada e todo o líquido transferido para coluna de fermentação e, então, o processo foi conduzido até 96h com retirada periódica de amostras, que foram utilizadas para avaliação da concentração de açúcares presentes e etanol produzido.

Os dados obtidos no planejamento foram analisados com auxílio do software STATISTICA for Windows (StatSoft, Inc. V.5 Tulsa, OK, EUA). Nas condições indicadas pela análise dos resultados, procedeu-se a um novo experimento em triplicata.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

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

Tanto o bagaço *in natura* quanto pré-tratado foram caracterizados quanto a seus componentes (celulose, hemicelulose, lignina e cinzas), seguindo a metodologia padrão do NREL - *National Renewable Energy Laboratory* (SLUITER et al., 2011).

As análises dos teores de açúcares, ácido acético e etanol foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Agilent Technology 1200 series (Agilent, Estados Unidos). As amostras foram previamente filtradas em filtro Sep Pak C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração RID 6A; fase móvel ácido sulfúrico 0,01 N e fluxo de 0,6 mL/min.

Para determinação da quantidade de preparação de celulasas a ser adicionada ao meio contendo bagaço de cana-de-açúcar, as atividades celulolíticas serão determinadas segundo a metodologia descrita por Ghose (1987).

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

4. 7 PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO

a) Fator de rendimento (ou de conversão) de substrato em etanol ($Y_{p/s}$, g etanol/g substrato)

$$Y_{p/s} = \Delta P / (-\Delta S) = (P_f - P_i) / (S_i - S_f) \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que:

P_f : concentração final de produto

P_i : concentração inicial de produto

S_f : concentração final de substrato

S_i : concentração inicial de substrato

Obs. O consumo de açúcares ($S_f - S_i$) nos processos foi calculado com base no balanço de massa feito considerando-se a composição do bagaço pré-tratado e do bagaço residual após a hidrólise.

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

$$Q_p = (P_f - P_i) / t \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que:

t : tempo de fermentação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 GRANULOMETRIA E CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO *IN NATURA*

O tamanho da partícula é importante em reações químicas, considerando-se que partículas menores apresentam maior superfície de contato e isso resulta em maiores taxas de reação. Vale ressaltar que algumas diferenças morfológicas são encontradas em amostras de bagaço, pois esta é uma biomassa heterogênea devido aos procedimentos de corte no campo e do processamento industrial (SOARES e ROSSELL, 2009). Assim, visando a uma maior homogeneidade das amostras empregadas, o bagaço foi moído em moinho de martelo e o resultado da análise granulométrica é apresentado na Figura 14 na forma de histograma.

Figura 14 – Análise granulométrica do bagaço moído em moinho de martelo

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com Soares e Rossell (2009), a análise granulométrica do bagaço apresenta os seguintes valores médios: fibras acima de 25 mm correspondem até 10% da amostra, fibras entre 5 e 25 mm até 50% e partículas

finas entre 1 e 8 mm até 10%. Considerando esta informação e os resultados obtidos (Figura 8), demonstra-se a eficácia do uso do moinho de martelo na redução do tamanho das partículas do bagaço, pois é possível verificar que, após a moagem, apenas 36,27% da amostra tem tamanho superior a 2,08 mm.

Para a realização do pré-tratamento utilizou-se o bagaço retido na peneira de 28 Mesh, ou seja, partículas com tamanho médio superiores a 0,5 mm, que correspondem a mais de 80% da amostra de bagaço utilizado.

Após a moagem e análise granulométrica, realizou-se a caracterização química do bagaço *in natura* (denominou-se *in natura* o bagaço após a moagem), cujo resultado é apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Caracterização química do bagaço *in natura*

Componentes	Teor (%)
Extrativo	4,11 ± 0,3
Lignina Solúvel	3,0 ± 0,01
Lignina Insolúvel	16,5 ± 1,4
Lignina Total	19,4 ± 1,4
Glucana	46,4 ± 0,2
Xilana	21,5 ± 0,4
Arabinosil	2,99 ± 0,3
Acetil	2,89 ± 0,1
Cinzas	2,5 ± 0,8
Total	99,89 ± 1,4

Fonte: Arquivo pessoal

Como pode ser observado na Tabela 7, no bagaço *in natura* a fração hemicelulósica correspondeu a aproximadamente 24%, enquanto a celulose correspondeu à maior parte do material, representando 46,4 % do total. Esses valores são, de uma forma geral, semelhantes aos encontrados na literatura, como apresentado na Tabela 8.

Tabela 8 – Composição química percentual do bagaço *in natura*: dados da literatura

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

Fonte: Arquivo pessoal

As diferenças apresentadas nos teores dos componentes principais podem ser atribuídas a diversos fatores específicos do próprio vegetal. Ernesto (2009) menciona que características como variedade do vegetal, irrigação do solo, clima do local e tempo decorrido após a última colheita são alguns dos fatores determinantes na composição química do material. Além disso, Santos et al. (2011) relatam que o tempo de estocagem, assim como altos teores de umidade na amostra, podem interferir nessas características químicas e, por isso, é interessante a utilização do bagaço imediatamente após sua produção, para evitar longos períodos de armazenamento e possíveis alterações. A fim de evitar problemas relacionados ao armazenamento, é ideal que o bagaço esteja com valores de umidade próximos a 10%. Para a realização deste trabalho, a amostra foi previamente seca, apresentando umidade de 12,98%.

5. 2 PRÉ –TRATAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO

O bagaço, após pré-tratamento com solução de NaOH na razão mássica NaOH:bagaço (massa seca) de 0,27, foi caracterizado quanto aos seus componentes químicos e os resultados dessa caracterização são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH

Componentes	Teor (%)
Lignina Solúvel	2,62 ± 0,1
Lignina Insolúvel	7,96 ± 0,9
Lignina Total	10,58 ± 0,93
Glucana	62,39 ± 2,33
Xilana	16,91 ± 4,29
Arabinosil	2,99 ± 0,28
Total	92,3 ± 2,2

Fonte: Arquivo pessoal

Com base nos resultados apresentados na Tabela 9, em comparação aos dados da Tabela 7, verifica-se que o teor de celulose no bagaço passou de 46,4% para 62,39%, enquanto o teor de lignina reduziu de 19,4% para 10,58%, indicando a eficácia do pré-tratamento alcalino utilizado na alteração da composição química do bagaço. De fato, Chen et al. (2015) mencionam que o pré-tratamento altera a estrutura complexa dos materiais lignocelulósicos, permitindo melhor ação enzimática na etapa de hidrólise. Isso ocorre pela redução do teor de lignina, que no material lignocelulósico é o componente responsável pela rigidez da parede celular, dificultando o acesso das enzimas ao substrato (JORGENSEN, et al. 2007). Portanto, a redução de lignina é essencial para o aumento do rendimento da hidrólise e o pré-tratamento utilizado se mostrou eficaz nesse aspecto.

Os resultados obtidos nessa pesquisa são similares também aos apresentados por Terán-Hilares et al. (2016a) os quais relatam pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com solução de NaOH, reportando aumento no teor de celulose e diminuição no teor de lignina após o processo.

Ao longo dessa pesquisa o grupo do Laboratório de Biopolímeros, Biorreatores e Simulação de Processos (LBBSIM)/EEL-USP desenvolveu trabalhos utilizando o pré-tratamento alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica e, diante dos resultados promissores obtidos, optou-se por utilizar esse pré-tratamento para os experimentos nos sistemas SSCF.

O bagaço, após pré-tratamento com solução de NaOH/H₂O₂ assistido por cavitação hidrodinâmica, também foi caracterizado quanto aos seus componentes químicos e os resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH/H₂O₂ assistido por cavitação hidrodinâmica

Componentes	Teor (%)
Lignina Solúvel	2,1 ± 0,03
Lignina Insolúvel	11,2 ± 1,10
Lignina Total	13,4 ± 1,41
Glucana	55,92 ± 0,38
Xilana	20,9 ± 0,75
Arabinosil	2,6 ± 0,07
Total	92,72 ± 0,79

Fonte: Arquivo pessoal

Com base nos resultados apresentados na Tabela 10, em comparação aos dados da Tabela 7, verifica-se que o teor de celulose no bagaço passou de 46,4% para 55,92%, enquanto o teor de lignina reduziu de 19,4% para 13,4%, o que representa uma redução de 30,92% na quantidade de lignina e um aumento de 21,04% na quantidade de celulose do material, indicando a eficácia do pré-tratamento alcalino utilizado na alteração da composição química do bagaço.

Ao comparar os resultados obtidos pelo pré-tratamento assistido por CH (Tabela 10) com o pré-tratamento alcalino (Tabela 9), nota-se que este último resultou em maior redução na quantidade de lignina do material. Porém, o pré-tratamento assistido por cavitação foi selecionado com para a avaliação dos sistemas de SSCF, considerando as condições mais amenas (tempo e temperatura) empregadas. Realmente, um dos objetivos desta pesquisa é a contribuição para o desenvolvimento de biorrefinarias e a busca por etapas de menor impacto ambiental faz parte desse processo. De fato, nos últimos anos há uma preocupação para que os processos sejam realizados de forma eficiente com menor tempo ou energia gastos no processo (GOGATE e KABAD, 2009). Nesse contexto, a escolha de CH é relevante, uma vez que essa tecnologia tem sido

relatada como promissora por utilizar condições mais brandas de temperatura e pressão e mais vantajosa quando comparada a processos convencionais, como o alcalino, pois é realizada em menor tempo e com baixa concentração de reagentes químicos (TERÁN-HILARES et al., 2018b). Além disso, a cavitação pode resultar em outras modificações estruturais no material, as quais contribuem para os bons resultados relatados na literatura empregando este método (Kim et al. 2015; TERÁN-HILARES et al., 2016b).

5. 3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO MATERIAL PRÉ-TRATADO EM FRASCOS ERLLENMEYER E EM COLUNA COM LEITO FIXO PERCOLADO

Com o bagaço pré-tratado por processo alcalino realizou-se uma hidrólise em frasco por 48 h com diferentes cargas enzimáticas, a fim de se determinar as condições ideais para a realização da hidrólise em coluna. Os resultados dessa hidrólise são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados obtidos nos experimentos de Hidrólise enzimática em frascos Erlemeyer empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo alcalino

	Concentração de glicose (g/L)	% Celulose Hidrolisada
10 FPU	9,88 ±0,42	84,98 ± 3,59
15 FPU	11,40 ±0,52	98,12 ± 4,51
20 FPU	12,15 ± 0,12	104,56 ± 1,05

Fonte: Arquivo pessoal

Observa-se na Tabela 11 que, após 48 h de hidrólise, a concentração de glicose no meio era de 9,88 g/L no frasco com carga enzimática 10FPU/ g de bagaço, sendo essa a carga enzimática que resultou em menor rendimento (84,98%). Nos frascos com carga enzimática de 15 FPU/ g de bagaço e 20 FPU/ g de bagaço, a diferença de rendimento observada foi muito pequena, demonstrando que, nessa faixa, o aumento da carga enzimática não representou grande aumento de eficácia do processo.

Em um estudo realizado por Visser et al., (2015), foi realizada a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, previamente pré-tratado com NaOH 1,5% a 120°C,

com carga enzimática 15 FPU/g o rendimento foi de 51% e na hidrólise realizada com carga de 30 FPU/g o rendimento foi de 55%. Com base nesses resultados os pesquisadores concluíram que aumento no período de hidrólise seria mais eficaz do que o aumento da carga enzimática.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 11 juntamente com os dados encontrados na literatura, optou-se por realizar a hidrólise em coluna com a carga enzimática de 15 FPU/ g de bagaço. Visando-se a um maior rendimento da hidrólise, na coluna o meio foi suplementado com um complexo de celulasas e hemicelulasas rico em β -glucosidase, com carga de 20 UI/ g de bagaço.

A hidrólise em reator de coluna foi conduzida por 24 h e foram retiradas amostras ao longo desse período para análise em HPLC. Os dados de concentração de glicose e xilose ao longo das 24 h são apresentados nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

Figura 15 – Concentração de glicose ao longo de 24 h de hidrólise enzimática em reator de coluna empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo alcalino

.Fonte: Arquivo pessoal

Como se pode observar na Figura 15, após 24h de hidrólise a concentração de glicose foi de $40,35 \pm 1,85$ g/L, representando 41,47% de

celulose hidrolisada. Esse valor é similar a alguns encontrados na literatura. Mahamuda e Gomes (2012), por exemplo, realizaram a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado foi com NaOH 2% e, após 48 h, obteve 33,11% de hidrólise.

Analizando os resultados apresentados na Figura 15, observa-se que a hidrólise ocorre em uma taxa mais elevada nas primeiras 2 horas. Neste tempo de processo, a concentração de glicose no meio foi de $24,16 \pm 4,6$ g/L, que representa 59,88% do total de glicose produzida após 24 h. Siqueira et al. (2013) também observaram que a hidrólise foi elevada nas primeiras 4 h e a conversão ideal de celulose em glicose foi atingida dentro 8 h de hidrólise. Esses pesquisadores sugerem que essa diminuição na taxa de hidrólise deve-se a um aumento da recalcitrância do material residual, pois as frações de maior facilidade para hidrólise são digeridos pelas celulasas nos primeiros momentos de reação, tornando a celulose restante menos acessível às enzimas.

Realmente, a diminuição da taxa de hidrólise tem sido atribuída à recalcitrância crescente do material, pois no início do processo este apresenta maior concentração de material de baixa cristalinidade, o qual é mais facilmente hidrolisado (SUN et al. 2016). Outro fato importante é que a atividade enzimática das celulasas sofre inibição de substâncias como celobiose e glicose (Andrić et al., 2010; Zhao et al., 2004) e, ao utilizar os processos de sacarificação/hidrólise simultâneos à fermentação, há uma redução da inibição, pois não há acúmulo de substrato no meio (OLOFSSON et al. 2008).

Como se pode observar na Figura 16, após 24h de hidrólise, a concentração de xilose foi de $13,63 \pm 0,5$ g/L, representando 42,94% de hemicelulose hidrolisada. Isso demonstra que a hidrólise da hemicelulose foi um pouco mais eficiente do que a hidrólise da celulose. Visser et al. (2015) mencionaram que a conversão de xilose é superior e provavelmente isso ocorra devido à estrutura amorfa da hemicelulose e ao baixo grau de polimerização dessa molécula. Nesse mesmo trabalho os pesquisadores relataram que os produtos de elevada atividade de xilanases em complexos enzimáticos afetam a eficiência da hidrólise da celulose e, para que haja aumento na concentração de glicose, é necessário a remoção de xilose da amostra, o que pode ser feito, por exemplo, em processos de hidrólise e co-fermentação em simultâneo.

Figura 16 – Concentração de xilose ao longo de 24 h de hidrólise enzimática em reator de coluna empregando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo alcalino

Fonte: Arquivo Pessoal

5. 4 PRODUÇÃO DE ETANOL NO PROCESSO SSCF

A avaliação da produção de etanol no processo de SSCF em colunas interligadas foi realizada empregando-se bagaço pré-tratado em sistema assistido por cavitação hidrodinâmica. As fermentações foram conduzidas por 96h, sendo a coluna de hidrólise retirada após 72h e o líquido transferido para a coluna de fermentação.

Para determinação dos efeitos da vazão de recirculação e da carga enzimática no desempenho do processo, foi realizado um planejamento fatorial completo (2^2) com triplicata no ponto central. A Figura 17 mostra o perfil de produção e consumo de açúcares no processo de SSCF, com reatores de colunas interligados em diferentes condições (Tabela 4), usando células imobilizadas de *S. shehatae* e bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo alcalino assistido por HC.

Figura 17 – Liberação e consumo de glicose (—●—) e xilose (—■—) durante o processo de SSCF em colunas interligadas usando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo alcalino assistido por HC e por células imobilizadas de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2

Condições:

A- vazão: 14 mL/min (-1) e carga enzimática: 5 FPU/g (-1) B- vazão: 35 mL/min (+1) e carga enzimática: 5 FPU/g (-1)

C- vazão: 14 mL/min (+1) e carga enzimática: 15 FPU/g (+1) D- vazão: 250 mL/min (-1) e carga enzimática: 15 FPU/g (+1)

E- vazão: 24 mL/min (0) e carga enzimática: 10 FPU/g (0) - Valores médios das triplicatas realizadas.

Fonte: Arquivo pessoal

Observa-se na Figura 17 que, em todas as condições experimentais, a concentração de glicose no meio após 24 horas foi muito próxima de zero. Isso provavelmente se deve ao fato de que a taxa de hidrólise diminui após esse tempo, mas o consumo pelos microrganismos permanece ao longo da reação.

Isso foi demonstrado nessa pesquisa quando se realizou a hidrólise em coluna (Figura 14), sendo verificado que, nas primeiras 2h de reação, já havia aproximadamente 60% da glicose total que seria liberada em 24 horas de processo. Terán-Hilares et al. (2017b), ao realizar o processo SSF para produção de etanol, também com colunas interligadas, menciona que a liberação de glicose e xilose eram superiores nas primeiras 24 h, momento em que foi interrompida a hidrólise naquele trabalho. O consumo de glicose e xilose por células de *S. shehatae* imobilizadas em gel alginato é apresentado por Antunes (2015).

A xilose provavelmente foi consumida simultaneamente ou logo após o esgotamento da glicose, embora não seja possível visualizar isso em função do processo em simultâneo, sendo possível verificar na Figura 17 que na condição C, após a retirada da coluna de hidrólise 72h, com o esgotamento de glicose há consumo de xilose. O consumo de xilose pela levedura *S. shehatae* é mencionado por Medina (2013) e Antunes (2015), assim como no trabalho apresentado por Chandel et al. (2014) em que essa levedura apresentou, após 48h de fermentação em hidrolisado hemicelulósico, um consumo de 100% dos açúcares.

O bagaço residual de hidrólise foi pesado e caracterizado e com os dados obtidos determinou-se a digestibilidade enzimática dos processos que estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Digestibilidade enzimática (% de celulose e hemicelulose hidrolisada) nos processos de SSCF com células imobilizadas de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM para produção de etanol

Experimento	Celulose hidrolisada (%)	Hemicelulose Hidrolisada (%)
1	57,18	40,49
2	62,11	45,39
3	69,72	52,94
4	70,21	50,90
5	61,61	43,29
6	55,44	37,32
7	57,47	40,21

Fonte: Arquivo pessoal

As melhores taxas de hidrólise foram obtidas nas condições de maior carga enzimática (3 e 4) tanto para celulose quanto para hemicelulose. Terán-Hilares et al. (2017b) ao realizar o processo de SSF para produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar relata uma taxa de 62,33% de hidrólise da celulose. De fato esses valores são inferiores a outros relatados da literatura como por exemplo o reportado por Terán-Hilares et al. (2017a) que alcançou 93,05% e 94,45% de hidrólise da de celulose e hemicelulose, respectivamente após pré-tratamento alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica a 70°C e 30 min, demonstrando assim que condições mais severas de pré-tratamento melhoram a digestibilidade enzimática.

Os açúcares hidrolisados foram convertidos em etanol e ao longo de 96h de fermentação e valores de concentração deste produto estão apresentados na Figura 18.

Figura 18 – Produção de etanol durante o processo de SSCF em colunas interligadas usando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo alcalino assistido por HC e por células imobilizadas de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2

Condições:

- 1: ( ) vazão: 14 mL/min (-1) e carga enzimática: 5 FPU/g (-1)
- 2: ( ) vazão: 35 mL/min (+1) e carga enzimática: 5 FPU/g (-1)
- 3: ( ) vazão: 14 mL/min (+1) e carga enzimática: 15 FPU/g (+1)
- 4: ( ) vazão: 250 mL/min (-1) e carga enzimática: 15 FPU/g (+1)
- 5: ( ) vazão: 24 mL/min (0) e carga enzimática: 10 FPU/g (0) - Valores médios das triplicatas realizadas.

Fonte: Arquivo pessoal

Na Figura 18 é possível verificar que a maior concentração de etanol foi obtida nos experimentos 3 e 4, em que se utilizou o máximo de carga enzimática, sendo produzido, após 96h a concentração de 20,5 g/L e 20,01 g/L de etanol, respectivamente, demonstrando assim a influência desse parâmetro no processo. Os resultados foram analisados estatisticamente quanto aos valores obtidos para a variável resposta (Q_p) e a significância dos parâmetros pode ser observada no gráfico de Pareto da Figura 19. Os valores de produtividade volumétrica (Q_p), do fator de rendimento de substrato em produto ($Y_{p/s}$) e a eficiência dos processos são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Produtividade volumétrica, fator de rendimento de substrato em produto ($Y_{p/s}$) e eficiência obtidos nos experimentos de SSCF com células imobilizadas de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM para produção de etanol.

Experimento	Produtividade volumétrica (Q_p) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	fator de rendimento de substrato em produto ($Y_{p/s}$) (g/g)	Eficiência (%)
1	0,21	0,068	13,41
2	0,22	0,105	20,66
3	0,56	0,487	95,52
4	0,84	0,492	96,54
5	0,19	0,448	87,89
6	0,16	0,454	88,92
7	0,14	0,384	75,29

** Eficiência calculada considerando-se um $Y_{p/s}$ teórico de 0,51 g/g,

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com os resultados da Tabela 13, os melhores valores de fator de rendimento e eficiência foram obtidos nos processos com carga enzimática de 15FPU/g. Considerando-se o maior rendimento obtido (0,492 g de etanol/ g de açúcar consumido), este foi superior ao reportado por Antunes et al. (2016), no qual a levedura *S. shehatae* UFMG-HM 52.2 foi imobilizada em alginato de cálcio para realização da fermentação para produção de etanol e o fator de rendimento de substrato em produto foi de 0,31 g/g e em que os autores relatam as vantagens do uso de células imobilizadas. De fato, o uso de imobilização celular

potencializa o processo fermentativo, permitindo o uma alta concentração celular, e protege as células dos efeitos inibitórios (Martinez-Garcia et al., 2011). Cabe comentar, porém, que no trabalho de Antunes et al. (2016) foi utilizado hidrolisado hemicelulósico obtido de de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico, com concentração de xilose inicial de 30 g/L, e o processo para produção de etanol foi SHF, dificultando a comparação com o presente trabalho.

Figura 19 - Gráfico de pareto para a variável dependente produtividade volumétrica (Q_p) de acordo com os resultados do planejamento estatístico 2^2 realizado para avaliação da influência das variáveis carga enzimática (A) e vazão de recirculação (C) na produção de etanol durante o processo de SSCF em colunas interligadas usando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por processo alcalino assistido por HC empregando células imobilizadas de *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2. Nível de confiança: 90%

Fonte: Arquivo pessoal

Conforme mostrado na Figura 19, ambas as variáveis foram significativas no processo, sendo que, entre elas, a carga enzimática exerce maior influência que a vazão de recirculação. Os efeitos de ambas as variáveis foram positivos, com efeito significativo e positivo também para a interação entre elas, indicando que há sinergismo entre essas duas variáveis, as quais contribuem em conjunto para aumento no valor de produtividade volumétrica em etanol. Conforme

mostrado na Tabela 13, a maior produtividade volumétrica foi obtida no experimento 4 ($0,84 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em que foi utilizado o valor máximo para cada variável, sendo que a menor produtividade ($0,21 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi obtida no experimento no qual se utilizaram os valores mínimos dos parâmetros analisados.

Observou-se também, na Figura 19, um efeito significativo para a curvatura. Isto indica proximidade do ponto ótimo para a produtividade em função das variáveis estudadas, indicando ainda que um modelo quadrático poderia explicar melhor a variabilidade dos resultados em comparação a um modelo de primeira ordem. De fato, não foi possível a composição de um modelo de primeira ordem satisfatório para as variáveis estudadas na faixa de valores avaliada. De qualquer forma, os resultados mostraram forte efeito positivo da carga enzimática, indicando que poderia haver benefícios em estender a faixa de estudos para níveis superiores desta variável para a execução de experimentos visando à composição de um modelo quadrático. Isto, no entanto, resultaria em maior consumo de enzimas no processo, o que tem sido apontado como desvantajoso do ponto de vista econômico (ALBARELLI et al. 2014). Assim, considerando que o efeito da carga enzimática pode ter contribuído para a produção de etanol em função da liberação de maiores concentrações de açúcares no meio, uma estratégia mais interessante poderia ser o aumento no teor de sólidos, ao invés de uso de maior carga enzimática por massa de bagaço, o que também resultaria em maior concentração de açúcares no hidrolisado. Isto poderia ser feito em trabalhos futuros nos quais mais de uma coluna de hidrólise poderia ser acoplada à de fermentação. No presente projeto, manteve-se a carga máxima em 15 FPU/g e não se buscou a composição de um modelo quadrático.

Dentre os diversos fatores que influem na hidrólise enzimática (pH, temperatura, concentração de substrato), a carga de enzimas exerce um importante papel no aumento da taxa de hidrólise (Vásquez, 2007), resultando em maior liberação de açúcares e, conseqüentemente, maior produção de etanol, como mostrado nos resultados do presente trabalho.

Em relação a vazão de recirculação, o aumento da mesma promove melhores taxas de transferência de substratos e produtos e, conseqüentemente, melhores resultados no processo de SSCF. Porém, é possível verificar na Figura 17 que o consumo de xilose ocorreu em maior extensão na condição C, em que a vazão de recirculação era mínima. Isto pode estar relacionado ao fato de que, ao

se utilizar vazão máxima, há um maior arraste de células livres e, devido à temperatura na coluna de hidrólise (50°C), provavelmente há diminuição da concentração celular total. Realmente, observou-se que as células cresceram não apenas nas esferas de alginato, mas também em forma livre no meio, conforme mostrado em trabalhos anteriores (ANTUNES, 2015; ANTUNES et al., 2016). As células livres presentes também representam uma contribuição no processo e, no caso de elevadas vazões, parte destas poderiam ter sido inativadas. Em trabalhos futuros poderia ser analisada ao longo do processo de SSCF a variação de concentração celular em diferentes vazões de recirculação a fim de se confirmar se o aumento da vazão promove a diminuição da concentração celular e, conseqüentemente, menor consumo de substrato.

Os resultados obtidos indicam que, nas condições avaliadas, os melhores valores para as variáveis em estudo visando à produção de etanol corresponderam ao emprego dos valores máximos de carga enzimática (15 FPU/g) e de vazão de recirculação (35 mL/min), com os quais se obtiveram eficiência de 96,54%, rendimento de 0,492 g/ g e produtividade de 0,84 g.L⁻¹.h⁻¹. Na prática, no entanto, essa condição de vazão de recirculação resultou em problemas como elevada perda de carga e, conseqüentemente, vazamentos na coluna. Então optou-se por utilizar a condição de 15 FPU/g e 14 mL/min, uma vez que nestas condições a eficiência e rendimento foram muito próximos aos obtidos com a máxima vazão de recirculação, 95,52% e 0,487 g/ g, respectivamente.

Procedeu-se então a um novo experimento, em triplicata, nas condições selecionadas. Neste caso, no entanto, utilizou-se uma menor quantidade de bagaço nas colunas (redução de cerca de 10%) e conduziram-se os experimentos por 120h, com retirada da coluna de hidrólise após 72h, como nos experimentos anteriores. Os resultados de concentração de açúcares bem como a produção de etanol nesse processo estão apresentados na Figura 20.

Os experimentos foram conduzidos por 120h e, na Figura 20, é possível verificar que, após 96h, houve diminuição na concentração de etanol. Isto também foi verificado no trabalho de Lebeau et al. (2007), em um trabalho com células de *S. cerevisiae* e *S. shehatae* co-imobilizadas. Neste trabalho, os autores verificaram consumo de etanol após esgotamento de glicose, mesmo havendo xilose no meio. O consumo de etanol pela *S. shehatae* foi observado também por Antunes et al. (2014) e Chandel et al. (2013).

Figura 20 – Liberação e consumo glicose (—♦—) e xilose (—■—) e produção de etanol (—▲—) por *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2 imobilizadas durante o processo de SSCF, realizado nas condições selecionadas, em colunas interligadas usando SCB pré-tratado com CH

Fonte: Arquivo pessoal

No experimento cujos resultados foram mostrados na Figura 20, o rendimento de hidrólise de celulose e hemicelulose foi de $70,72 \pm 1,31$ e $56,37 \pm 0,76$, respectivamente. Além disso, o fator de rendimento de substrato em produto ($Y_{p/s}$) foi de 0,493 g/g, a produtividade volumétrica foi $0,469 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e a eficiência de 96,58%, valores estes próximos aos obtidos anteriormente. Esses resultados são semelhantes aos relatados por Terán-Hilares et al. (2017b), os quais utilizaram bagaço e cana-de-açúcar pré-tratado em meio alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica para produção de etanol no processo de SSCF em reatores de coluna interligadas utilizando células imobilizadas de *Scheffersomyces stipitis*. No trabalho destes autores, após 96 horas, obteve-se eficiência de 94% e 0,48 g/g de fator de rendimento. De acordo com os pesquisadores, a alta eficiência observada deve-se à utilização das colunas interligadas, que permitem a realização dos processos de hidrólise e fermentação em condições ótimas de temperatura, além das demais vantagens apresentadas pela configuração do processo.

Os resultados obtidos no presente trabalho são difíceis de ser comparados com dados encontrados na literatura, tendo em vista as diferenças no pré-tratamento empregado, levedura selecionada e condições de processo como o uso de colunas interligadas para o processo de se SSCF. Porém, os resultados obtidos mostraram-se promissores quando comparados com trabalhos de produção de etanol encontrados na literatura. Alguns dados comparativos são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Condições e principais resultados obtidos no presente trabalho e encontrados na literatura referentes a parâmetros fermentativos de produção de etanol

Condições de processo	Resultados	Referência
Bagaço de cana-de-cana de açúcar	Yp/s: 0,493 g/g,	Presente
Pré-tratamento alcalino assistido por CH	Qp: 0,469 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	pesquisa
SSCF	Eficiência: 96,58%	
Colunas interligadas		
Células imobilizadas de <i>S. shehatae</i>		
Bagaço de cana-de-cana de açúcar	Yp/s: 0,48 g/g	Terán-Hilares
Pré-tratamento alcalino assistido por CH	Eficiência: 94%	et. al (2017b)
SSCF		
Colunas interligadas		
Células imobilizadas de <i>S. stipitis</i>		
Hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar	Yp/s: 0,31 g/g	Antunes et al.
SHF	Qp: 0,12 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	(2016)
Frascos Erlenmeyer		
Células imobilizadas de <i>S. shehatae</i>		
Juncos pré-tratados com alcali e cavitação hidrodinâmica	Eficiência: 90,1%	Kim et al.
SSF	Qp: 0,36 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	(2015)
<i>S. cerevisiae</i>		

Fonte: Arquivo pessoal

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- ✓ A realização do pré-tratamento alcalino assistido por cavitação hidrodinâmica, assim como o processo de SSCF, favorecem a hidrólise da celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar, obtendo-se, no presente trabalho, um rendimento de hidrólise de até 70% e 56% para a celulose e hemicelulose, respectivamente;
- ✓ A taxa de hidrólise das frações carboidrato do material é superior nas primeiras horas de processo;
- ✓ As variáveis analisadas (vazão de recirculação e carga enzimática) apresentam efeitos principais e de interação significativos e positivos na produtividade volumétrica em etanol ($p < 0,1$), sendo que a carga enzimática exerce maior influência no processo SSCF em colunas interligadas;
- ✓ As condições selecionadas para produção de etanol utilizando o sistema de SSCF empregando reatores de coluna interligados e utilizando células de *Scheffersomyces shehatae* imobilizadas em gel de alginato de cálcio correspondem a uma carga enzimática de 15 FPU/g e vazão de recirculação de 14 mL/min;
- ✓ O sistema de SSCF empregando reatores de coluna interligados e utilizando células de *Scheffersomyces shehatae* imobilizadas em gel de alginato de cálcio mostra-se como promissor para produção de etanol, apresentando resultados superiores ao relatados na literatura, correspondendo, nas condições selecionadas, a um fator de conversão de substrato em produto de 0,493 g/g, produtividade volumétrica de 0,469 g.L⁻¹.h⁻¹ e eficiência de 96,58%.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Realização de experimentos utilizando duas ou mais colunas de hidrólise acopladas a uma coluna de fermentação;
- ✓ Avaliação do uso de cocultura de *S. cerevisiae* e *S. shehatae* no sistema SSCF com colunas acopladas;
- ✓ Avaliação do impacto do uso de sistemas SSCF com colunas interligadas na viabilidade econômica do processo.

REFERÊNCIAS

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

ALBARELLI, J. Q.; ENSINAS, A. V.; SILVA, M. A. Product diversification to enhance economic viability of second generation ethanol production in Brazil: the case of the sugar and ethanol joint production. **Chemical Engineering Research and Design**, v.92, p. 1470-1481, 2014.

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. 4581-4861, 2010.

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

ANDRADE, L. P.; CRESPIM, E.; OLIVEIRA, N.; CAMPOS, R. C.; TEODORO, J. C.; GALVÃO, M. A.; FILHO, P. M. Influence of sugarcane bagasse variability on sugar recovery for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 75-81, 2017.

ANDRIĆ, P.; MEYER, A. S.; JENSEN, P. A.; DAM-JOHANSEN, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 308–324, 2010.

ANTUNES, F. A. A; BRUMANO, L. P.; CHANDEL, A. K.; TERÁN-HILARES, R.; RIBEIRO, J. S.; SILVA, V. S. MACHADO, P. E. M.; SILVA, G. M.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. A new facile approach for xylitol production from sugarcane bagasse in fluidized bed reactor by a novel Brazilian wild yeast. In: Méndez-Vilas, A.(Ed.). **Exploring Microorganisms: Recent Advances in Applied Microbiology**. Irvine & Bocaraton: Brown Walker Press, 2018. p. 116 – 119.

ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; BRUMANO, L. P.; TERÁN-HILARES, R.; PERES, G. F. D.; AYABE, L. E. S.; SORATO, V. S.; SANTOS, L. R.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. A novel process intensification strategy for second-generation ethanol production from sugarcane bagasse in fluidized bed reactor. **Renewable Energy**, v.124, p. 189-196, 2018.

ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; SANTOS, J. C.; ROSA, C. A.; 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. 4, p.1-8, 2014.

ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; SANTOS, J. C.; MILESSI, T. S. S.; PERES, G. F. D.; SILVA, S. S. Hemicellulosic ethanol production in fluidized bed reactor from sugar cane bagasse hydrolysate: interplay among carrier concentration and aeration rate. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, v.5, p. 8250–8259, 2017.

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 (Doutor em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

ANTUNES, F. A. F.; SANTOS, J. C.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; PERES, G. F. D.; SILVA, S. S. Hemicellulosic ethanol production by immobilized wild brazilian yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Effects of cell concentration and stirring rate. **Current Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 133-138, 2016.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 163-173, 2014.

ARRUDA, P. V.; SANTOS, J. C.; RODRIGUES, R. C. L. B.; SILVA, D. D. V.; YAMAKAWA, C. K.; ROCHA, G. J. M.; JUNIOR, J. N.; PRADELLA, J. G. C.; ROSSELL, C. E. V.; FELIPE, M. G. A. F. Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 47, p. 297-302, 2017.

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

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

BADVE, M. P.; GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B.; CSOKA, L. Hydrodynamic cavitation as a novel approach for delignification of wheat straw for paper manufacturing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.21, p. 162–168, 2014.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v.26, p. 89–105, 2008.

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

BEN – BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL (BEN) – Relatório Síntese, ano base 2016. Rio de Janeiro: Ministério de Minas e Energia – MME; Empresa de Pesquisa Energética – EPE, Rio de Janeiro, RJ, Junho de 2017, Disponível em <https://ben.epe.gov.br/BENRelatorioSintese.aspx?anoColeta=2017&anoFimColeta=2016> Acesso em 20 de junho de 2018.

BENTO, C. B.; FILOSO, S.; PITOMBO, L. M.; CANTARELLA, H., ROSSETTO, R.; MARTINELLI, L. A.; CARMO, J. B. Impacts of sugarcane agriculture expansion over low-intensity cattle ranch pasture in Brazil on greenhouse gases. **Journal of Environmental Management**, v.206, p. 980-988, 2018.

BEZERRA, T. L. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioprod. Bioref.** v. 10, p. 634–647, 2016.

BHATTACHARYA, A. S.; BHATTACHARYA, A.; PLETSCHKE, B. I. Synergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective for enhanced bio-ethanol production. **Biotechnol Lett**, v. 37, p. 1117–1129.

BHUTTO, A. W.; QURESHI, K.; HARIJAN, K. ABRO, R.; ABBAS, T.; BAZMI, A. A.; KARIM, S.; YU, G. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Energy**, v.122, p. 724-745, 2017.

BILGILI, F.; OZTURK, I. Biomass energy and economic growth nexus in G7 countries: evidence from dynamic panel data. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p.132-138, 2015.

BORREGA, M., SIXTA, H. Water prehydrolysis of birch wood chips and meal in batch and flow-through systems: a comparative evaluation. **Ind. Eng. Chem. Res.** v. 54, p. 6075–6084, 2015.

CANAONLINE. **Etanol 2G permite às usinas aumentar a produção em até 40% sem ampliar a área plantada.** 2015. Disponível em: <http://www.canaonline.com.br/conteudo/etanol2g-permite-as-usinas-aumentar-a-producao-em-ate40-sem-ampliar-a-area-plantada.html#.V-GVGSErLDd> Acesso em: 08 de setembro de 2016.

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

CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. Jr.; Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. **Química Nova**, v. 33, n. 1 p. 181-188, 2010.

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. A.; DA SILVA, S. S.; Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process sequential acid-base pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuel**, v. 7, p. 63, 2014.

CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A. A.; ANJOS, V.; BELL, M. J. V.; 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 for Biofuels**, v.6, p. 1-15, 2013.

CHEN, H.; ZHAO, J.; HU, T.; ZHAO, X.; LIU, D. A comparison of several organosol pretreatments for improving the enzymatic hydrolysis of wheat straw: substrate digestibility, fermentability and structural features. **Appl. Energy**, v.150, p. 224–232, 2015.

CONAB - **Cana-de-açúcar tem queda de 3,6% e fecha safra 2017/18 em 633,26 milhões de t** (2018) Disponível em <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2327-cana-de-acucar-tem-queda-de-3-6-e-fecha-safra-2017-18-em-633-26-milhoes-de-t> Acesso em 19 de junho de 2018.

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, p. 143-160, 2007.

DEVARAPALLI, M.; ATIYEH, H. K. A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation. **Biofuel Research Journal**, v.7, p. 268-280, 2015.

DUSSÁN, K. J.; SILVA, D. D. V.; PEREZ, V. H.; SILVA, S. S. Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. **Renewable Energ.** v. 87, p. 703-710, 2016.

ERNESTO, V. A. R. T. **Caracterização térmica do bagaço da cana-de-açúcar visando aproveitamento energético**. 2009. 115 p. Dissertação (Mestre em Química). Instituto de química de Araraquara; Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

ES, I.; GONÇALVES, J. D.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, p. 2065–2082, 2015.

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

FILOSO, S.; CARMO, J. B.; MARDEGAN, S. F.; LINS, S. R. M.; GOMES, T. F.; MARTINELLI, L. A. Reassessing the environmental impacts of sugarcane ethanol production in Brazil to help meet sustainability goals. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.52, p.1847-1856, 2015.

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

GENISHEVA, Z.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, J. M. Immobilized cell systems for batch and continuous winemaking. **Trends in Food Science & Technology**, v.40, p. 33-47, 2014.

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

GOGATE, P. R.; KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 60–72, 2009.

GUILHERME, A. A. **Estudo experimental e modelagem do processo de sacarificação e fermentação simultânea utilizando bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol**. 2014. 258 p. Tese (Doutor em Engenharia Química). Centro Tecnológico; Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. **Process Biochemistry**, v. 47, p.1287-1294, 2012.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 10-18, 2009.

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

IQBAL, H. M. N.; KYAZZE, G.; KESHAVARZ, T. Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: an overview. **Biotech Application of Biomassa**, v.8, p.3157-3176, 2013.

ISHOLA, M. M.; JAHANDIDEH, A.; HAIDARIAN, B.; BRANDBERG, T.; TAHERZADEH, M. J. Simultaneous saccharification, filtration and fermentation (SSFF): A novel method for bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 68–73, 2013.

JIN, M.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; LAU, M. W.; DALE, B. E. Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of AFEXTM pretreated corn stover for ethanol production using commercial enzymes and *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST). **Bioresource Technology**, v.110, p.587-594, 2012.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J.B; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 2, p. 119–134, 2007.

JUNQUEIRA, T. L. Biorrefinaria: de olho no futuro. **Revista Opiniões**. Sucroenergético: cana, açúcar, etanol & bioeletricidade. Ano 13, n. 49, 2016. Disponível em: <http://sucroenergetico.revistaopinioes.com.br/revista/detalhes/8-biorrefinaria-de-olho-no-futuro/>. Acesso em: 08 de setembro de 2016.

KAMAT, S.; MAHESH, K.; ZINJARDE, S.; RAVIKUMAR, A.; GADE, W. N. Coupled production of single cell oil as biodiesel feedstock, xylitol and xylanase from sugarcane bagasse in a biorefinery concept using fungi from the tropical mangrove wetlands. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 246-253, 2013.

KANTARCI, N.; BORAK, F.; ULGEN, K. O.; Bubble column reactors. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2263–2283, 2005.

KHUONG, L. D.; KONDO, R.; LEON, R.; ANH, T. K.; SHIMIZU, K.; KAMEI, I. Bioethanol production from alkaline-pretreated sugarcane bagasse by consolidated bioprocessing using *Phlebia* sp. MG-60. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 62-68, 2014.

KIM, I.; LEE, I.; JEON, S. H.; HWANG, T. HAN, J. I. Hydrodynamic cavitation as a novel pretreatment approach for bioethanol production from reed. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 335–339, 2015.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.199, p. 42–48, 2016.

KOBAYASHI, Y.; SAHARA, T.; SUZUKI, T.; KAMACHI, S.; MATSUSHIKA, A.; HISHINO, T.; OHGIYA, S.; KAMAGATA, Y.; FUJIMORI, K. E. Genetic improvement of xylose metabolism by enhancing the expression of pentose phosphate pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae* IR-2 for high-temperature ethanol production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 44, p. 879–891, 2017.

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.

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

LAI, Z.; ZHU, M.; YANG, X.; WANG, J.; LI, S. Optimization of key factors affecting hydrogen production from sugarcane bagasse by a thermophilic anaerobic pure culture. **Biotechnology for Biofuels**. v.7, p. 1-11, 2014.

LEBEAU, T.; JOUENNE, T.; JUNTER, G. A. Long-term incomplete xylose fermentation, after glucose exhaustion, with *Candida shehatae* co-immobilized with *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Research**, v. 162, p. 211—218, 2007.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. **Novos estudos**, v. 78 p. 15-21, 2007.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.38, p. 449-467, 2012.

LI, P.; SONG, Y.; WANG, S.; TAO, Z.; YU, S.; LIU, Y. Enhanced decolorization of methyl orange using zero-valent copper nanoparticles under assistance of hydrodynamic cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 132–138, 2015.

LORENCINI, P. **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio**. 2013. 74 p. Dissertação (Mestre em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

LYNDY, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnonology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p.506-577, 2002.

MADISON, M. J.; COWARD-KELLY, G.; LIANG, C.; KARIM, M. N.; FALLS, M.; HOLTZAPPLE, M. T. Mechanical pretreatment of biomass e part I: acoustic and hydrodynamic cavitation. **Biomass and Bioenergy**, v. 98, p. 135-141, 2017.

MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; ANNA, L. M. M. S.; PEREIRA JR, N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 38-44, 2013.

MAHAMUD, M. R.; GOMES, D. J. Enzymatic saccharification of sugar cane bagasse by the crude enzyme from indigenous fungi. **Journal of Scientific Research**, v.4, p. 227-238, 2012.

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.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 142 p. Dissertação (Mestre em Ciências Físico-Química). Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p. 426-432, 2007.

MARTÍNEZ, T. G.; PUIG-PUJOL, A.; PEINADO, R. A.; MORENO, J.; MAURICIO, J. C. Potential use of wine yeasts immobilized on *Penicillium chrysogenum* for ethanol production. **J Chem Technol Biotechnol.**, v. 87, p. 351–359, 2012.

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.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 84, p. 37–53, 2009.

MEDINA, K. J. D. **Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético.** 2013. 171 p. Tese (Doutora em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena; Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

MILESSI, T. S. S. **Imobilização de células de *Scheffersomyces stipitis* para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta.** 2012. 148 p. Dissertação (Mestre em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Última estimativa da safra de cana fecha em 633 milhões de toneladas** (2018) Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/ultima-estimativa-da-safra-de-cana-fecha-em-633-milhoes-de-toneladas>. Acesso em 20 de junho de 2018.

MODENBACH, A.; NOKES, S. E. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment - a review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, ed. 6, 2012.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

MORO, M. K. **Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-rosca.** 2015. 107 p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós Graduação e Pesquisa de Engenharia; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

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

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

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

NEVES, P. V.; PITARELO, A. P.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p.184-194, 2016.

NIKOLIC, S.; MOJOVIC, L. RAKIN, M; PEJIN, D.; NEDOVIC, V. Effect of different fermentation parameters on bioethanol production from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoideus. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 84, p. 497-503, 2009.

OGATA, B. H. **Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias**. 2013. 108 p. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

ÖHGREN, K., BURA, R., LESNICKI, G., SADDLER, J., ZACCHI, G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 834-839, 2007.

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

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v.1, n.7, p.1-14, 2008.

PLANGKALANG, P.; REUNGSANG, A; PATTRA, S. Enhanced bio-hydrogen production from sugarcane juice by immobilized *Clostridium butyricum* on sugarcane bagasse. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 15525-15532, 2012.

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

PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. cap.16, p.355-372.

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

RENNIE, E. A.; SCHELLER, H. V. Xylan biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 100–107, 2014.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; 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.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**. v. 454, p. 841-845, 2008.

RUEDA, S. M. G. **Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 130 p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química; Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SANTOS, E. L. I.; ROSTRO-ALANÍS, M.; PARRA-SALDÍVAS, R.; ALVAREZ, A. J. A novel method for bioethanol production using immobilized yeast cells in calcium alginate films and hybrid composite pervaporation membrane. **Bioresource Technology**. v. 247, p. 165-173, 2018.

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

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.; 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.

SILVA, G. T.; CHIARELLOA, L. M.; LIMA, E. M.; RAMOS, L. P. Sono-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for cellulosic ethanol production. **Catalysis Today**, v. 269, p. 21-28, 2016.

SILVA, L. **Estudo da hidrólise enzimática em alta consistência de materiais lignocelulósicos**. 2012. 86 p. Dissertação (Mestre em Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. (Ed.). **Biofuels in Brazil: fundamental aspects, recent developments, and future perspective**. [s.l.]: Springer, 2014. p. 2-8.

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

SINDHU, R.; GNANSOUNOU, E.; BINOD, P.; PANDEY, A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products: an overview. **Renewable Energy**. v.98, p.203-215, 2016.

SIQUEIRA, G.; VÁRNAI, A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**. v.102, p. 399-402, 2013.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R. O.; SCARLATA, C.; SLUITER, J., Templeton, D., & Energy, D. of. (2004). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure**, p. 1-14, 2011.

SOARES, P. A.; ROSSEL, C. E. V. Conversão da celulose pela tecnologia Organosolv. **NAIPPE/USP**, v. 3, 2009.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**. v. 199, p. 49–58, 2016.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAKEI, T.; IKEDA, K.; IJIMA, H.; KAWAKAMI, K.; Fabrication of poly(vinyl alcohol) hydrogel beads crosslinked using sodium sulfate for microorganism immobilization. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 556-571, 2011.

TERÁN-HILARES, R.; ALMEIDA, G. F.; AHMEDB, M. A.; ANTUNES, F. A. F.; SILVA, S. S.; HAN, JI.; SANTOS, J. C. Hydrodynamic cavitation as an efficient pretreatment method for lignocellulosic biomass: a parametric study. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 301-308, 2017.

TERÁN-HILARES, R.; KAMOEI, D. V.; AHMED, M. A.; SILVA, S. S.; HAN, JI.; SANTOS, J. C. A new approach for bioethanol production from sugarcane bagasse using hydrodynamic cavitation assisted-pretreatment and column reactors. **Sonoquímica Ultrassônica**, v.43, p.219-226, 2018.

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

TERÁN-HILARES, R.; ORSI, C. A.; AHMED, M. A.; MARCELINO, P. F.; MENEGATTI, C. R.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C. Low-melanin containing pullulan production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Aureobasidium pullulans* in fermentations assisted by light-emitting diode. **Bioresource Technology**, v. 230, p.76-81, 2017.

TERÁN-HILARES, R.; RAMOS, L.; SILVA, S. S.; DRAGONE, G.; MUSSATO, S. I.; SANTOS, J. C. Hydrodynamic cavitation as a strategy to enhance the efficiency of lignocellulosic biomass pretreatment. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.38, p.483-493, 2018.

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

TERÁN-HILARES, R.; SANTOS, J. C.; AHMED, M. A.; JEON, S. H.; SILVA, S. S.; HAN, JI. Hydrodynamic cavitation-assisted alkaline pretreatment as a new approach for sugarcane bagasse biorefineries. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 609-614, 2016.

VAN DYK, J. S.; PLERSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes - factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v.30, p. 1458–1480, 2012.

VANHOLME, B.; DESMET, T. RONSSE, F. RABAEY, K.; BREUSEGEM, F. V.; MEY, M.; SOETAERT, W.; BOERJAN, W. Towards a carbon-negative sustainable bio-based economy. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-17, 2013.

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

VÁSQUEZ, M. P. **Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. p.205. Tese (Doutor em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

VIOLA, E.; ZIMBARDI, F.; VALERIO, V.; NANNA, F.; BATTAFARANO, A. Use of a two-chamber reactor to improve enzymatic hydrolysis and fermentation of lignocellulosic materials. **Applied Energy**, v. 102, p. 198–203, 2013.

VISSER, E. M.; LEAL, T. F.; ALMEIDA, M. N.; GUIMARÃES, V. M. Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1-9, 2015.

WIRAWAN, F.; CHENG, C. L.; KAO, W.C.; LEE, D. J.; CHANG, J. S.; Cellulosic ethanol production performance with SSF and SHF processes using immobilized *Zymomonas mobilis*. **Applied Energy**, v. 100, P. 19-26, 2012.

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

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

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

ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.71, p. 475–501, 2017.

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

ZHAO, H.; JONES, C. L.; BAKER, G. A.; XIA, S.; OLUBAJO, O.; PERSON, V. N.
Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis.
Journal of Biotechnology, v. 139, p. 47–54, 2009.