

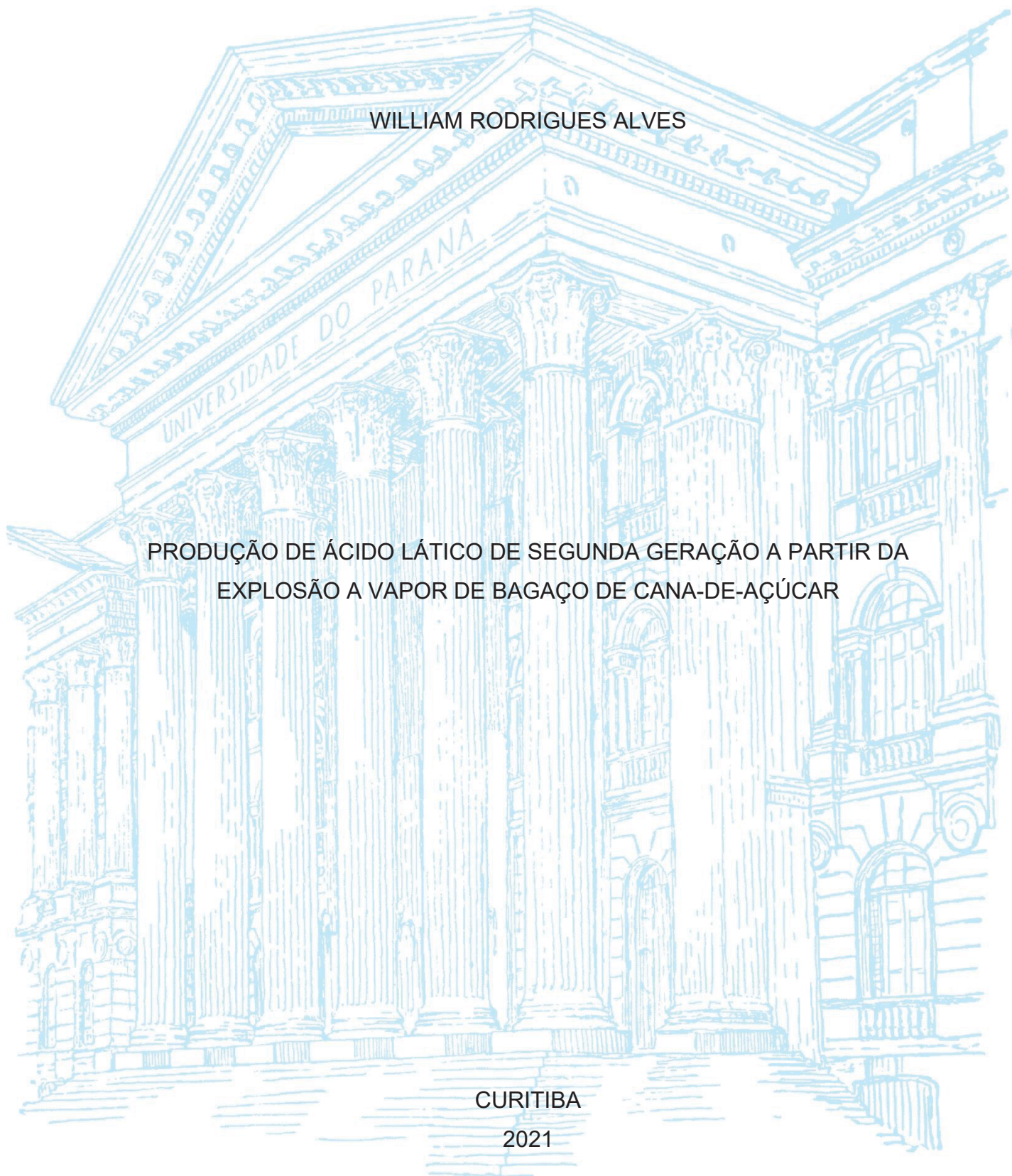
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WILLIAM RODRIGUES ALVES

PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DA  
EXPLOSÃO A VAPOR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

CURITIBA

2021



WILLIAM RODRIGUES ALVES

PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DA  
EXPLOSÃO A VAPOR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

---

A474p

Alves, William Rodrigues

Produção de Ácido láctico de segunda geração a partir da explosão a vapor de bagaço de cana-de-açúcar [recurso eletrônico] / William Rodrigues Alves – Curitiba, 2021.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

1. Dissertação. 2. Ácido láctico. 3. Bagaço de cana. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ramos, Luiz Pereira. III. Título.

CDD 547.215

---



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -  
40001016026P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **WILLIAM RODRIGUES ALVES** intitulada: **PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DA EXPLOSÃO A VAPOR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ PEREIRA RAMOS, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Novembro de 2021.

LUIZ PEREIRA RAMOS

Presidente da Banca Examinadora

CAROLINE DA ROS MONTES D'OCA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

LADERO GALAN  
MIGUEL - DNI  
07233750C

MIGUEL LADERO GALAN

Avaliador Externo (UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID)

Curitiba, 29 de novembro de 2021.

*Dedico,  
Aos meus amados pais, Dirceu e Leocilda  
além de minhas avós, que nos deixaram em 2021,  
Ivone e Lourdes (in memoriam).*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao meu Deus יהוה por minha vida e por acompanhar e guiar meus passos desde sempre.

Aos meus pais Dirceu e Leocilda, meus irmãos Vitor, Lucas, Patrícia e Caroline, por me apoiarem em todas as decisões, por seus ensinamentos e o mais importante, o amor que demonstram de tantas maneiras.

À minha esposa Carolina, por estar ao meu lado em todas as empreitadas dessa vida, por seu amor, cuidado, carinho e paciência durante esses anos e especialmente 2021, o melhor e ao mesmo tempo o mais difícil, por me incentivar e sempre apoiar em tudo.

Ao Professor Luiz Pereira Ramos pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, de ser orientado durante esses anos, por sua confiança no meu trabalho e por todos os conhecimentos compartilhados, certamente nosso encontro contribuiu muitíssimo para meu crescimento pessoal e profissional.

Às Professoras Doutoradas Sônia Faria Zawadzki e Nádia Krüger pelas contribuições e apontamentos no exame de qualificação.

Aos membros do CEPESQ, em especial Thiago, Maria Juliane e Antônio, por todo apoio e ajuda nos procedimentos e operação dos equipamentos, além das conversas e almoços agradáveis, pelas noites de trabalho no laboratório.

Aos meus colegas da Mérieux NutriSciences, Gabe, Dé, Victor, Cibelle, Gui e Gabriel, por todo ensinamento e técnicas experimentais em microbiologia e processos biotecnológicos, também por aturarem minhas reclamações e por sempre me incentivarem.

À minha psicanalista Eliane, por me ajudar a trilhar o caminho da vida através de uma profunda análise pessoal e também por me lembrar sempre de que existirão “imprevistos, já que não é possível anotá-los na agenda,” e acima de tudo, por me acompanhar durante o processo do luto.

Agradeço à UFPR, ao Programa de Pós-Graduação em Química e também aos que contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento desse projeto, meus sinceros agradecimentos.

*“Na ciência, é um serviço do mais alto mérito buscar aquelas verdades fragmentadas atingidas pelos antigos e desenvolvê-las ainda mais.”*

(Johann Wolfgang von Goethe, 1749-1832)

## RESUMO

O ácido láctico é um composto químico de grande aplicação na indústria, podendo ser utilizado como monômero para a produção de um polímero biodegradável, o poli-(ácido láctico), que é uma excelente alternativa aos plásticos derivados petroquímicos. O bagaço da cana-de-açúcar é uma das principais fontes naturais de celulose e hemiceluloses, das quais é possível obter glicose e xilose, para depois serem convertidas por processos fermentativos em produtos como o ácido L-láctico. No entanto, devido à estrutura recalcitrante da biomassa, é necessário submetê-la a um pré-tratamento para permitir que enzimas acessem e convertam os polissacarídeos estruturais do bagaço de cana em glicose e xilose. Após pré-tratamento e hidrólise enzimática, bactérias como *Bacillus coagulans* podem assimilar esses monômeros e convertê-los a ácido L-láctico com alta eficiência. Este trabalho teve como objetivo a produção de ácido láctico a partir da explosão a vapor do bagaço de cana a 195 °C em dois tempos de reação, 7,5 e 15 min. A fração sólida (BEV-FS) gerada no pré-tratamento foi dividida em duas, tendo sido uma parte lavada com água (BEV-FSL) e a outra somente centrifugada (BEV-FSC) antes do processo de hidrólise enzimática por 96 h empregando as enzimas Cellic CTec3 e Cellic HTec3 da Novozymes. A produção de ácido láctico foi realizada com a bactéria *B. coagulans* DSM2314 em configurações de SHF (hidrólise e fermentação em separado) e SHCF (hidrólise e fermentação em separado). A cofermentação direta de glicose e xilose na fração líquida bruta (BEV-FLB) da explosão a vapor também foi realizada, mas a presença de inibidores teve que ser contornada por destoxificação usando adsorção física em carvão ativado (BEV-FLD). Os resultados foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência usando coluna Rezex RHM a 65 °C, eluída com fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol·L<sup>-1</sup>. Os testes de fermentação foram realizados em biorreator Multifors 2 (Infors HT). O ensaio de destoxificação promoveu a remoção de mais de 50% de ácido acético e 95% de furfural e HMF da fração BEV-FLB. Maiores rendimentos de glicose foram obtidos por hidrólise enzimática a partir da fração BEV-FSL, que foram de 71 e 93 g·L<sup>-1</sup> para os tempos de reação de 7,5 e 15 min, enquanto as frações BEV-FSC produziram 59,8 e 89,9 g·L<sup>-1</sup> de glicose, respectivamente. A fermentação das frações BEV-FSL destoxificadas resultaram na produção de 15 e 5,9 g·L<sup>-1</sup> de ácido láctico para 7,5 e 15 min, respectivamente. Para as frações BEV-FSL tratadas por 7,5 min, foi possível obter 64,2 g·L<sup>-1</sup> por SHF e 64,1 g·L<sup>-1</sup> por SHCF. Já para a BEV-FSL tratada por 15 min, 56,9 g·L<sup>-1</sup> de ácido láctico foram obtidos no processo SHF e 76,7 g·L<sup>-1</sup> no processo SHCF. Assim, ambas as frações geradas no pré-tratamento puderam ser utilizadas para a produção de ácido láctico, revelando seu potencial para aplicações em biorrefinarias e evidenciado a possibilidade de eliminação da etapa de lavagem do substrato pré-tratado, diminuindo o custo operacional do processo.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, explosão a vapor, hidrólise enzimática, fermentação, ácido láctico.



## ABSTRACT

Lactic acid is a chemical compound with a wide application in the industry and that can also be used as monomer for the production of a biodegradable polymer, poly (lactic acid), which is the basis for the production of biodegradable plastics as alternatives to petrochemical derivatives. Sugarcane bagasse is one of the main sources of cellulose and hemicellulose, from which glucose and xylose can be converted by fermentation processes into products such as L-lactic acid. However, due to the recalcitrant structure of the biomass, it is necessary to submit it to a pre-treatment to allow enzymes to access and convert the polysaccharides from sugarcane bagasse into glucose and xylose. After pretreatment and enzymatic hydrolysis, bacteria such as *Bacillus coagulans* can assimilate these monomers and convert them into L-lactic acid with high efficiency. This work aimed to produce L-lactic acid from the pre-treatment of sugarcane bagasse by steam explosion under two conditions at 195 °C, 7.5 and 15 min. The solid pre-treated fraction (BEV-FS) generated was divided into two, one of them was water-washed (BEV-FSL) and the other only centrifuged (BEV-FSC), after that both were submitted to enzymatic hydrolysis process for 96 h (Cellic CTec3 e Cellic HTec3 from Novozymes). The co-fermentation of liquid fraction (BEV-FLB) obtained from the explosion was carried out and the presence of fermentation inhibitors was circumvented by detoxifying the fraction by physical adsorption on activated charcoal (BEV-FLD). The fermentation step was carried out with the bacteria *B. coagulans* DSM2314, in a separate enzymatic hydrolysis process (SHF) and in the co-fermentation of pentose and hexose fractions (SHCF). The data were obtained using High Performance Liquid Chromatography with a Rezex RHM column at 65 °C, eluted with mobile phase H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol·L<sup>-1</sup>. Fermentation tests were carried out using the Multifors 2 bioreactor (Infors HT). The detoxification assay promoted the removal of more than 50% acetic acid, 95% furfural and HMF from the BEV-FL fraction. Larger yields of glucose were generated in the enzymatic hydrolysis process from the BEV-FSL fraction 71 and 93 g·L<sup>-1</sup> for both treatments, 7.5 and 15 min, respectively. For the BEV-FSC fractions, 59.8 and 89.9 g·L<sup>-1</sup>, respectively. Fermentation of detoxified BEV-FL fractions resulted in 15 and 5.9 g·L<sup>-1</sup> of lactic acid for 7.5 and 15 min, respectively. For the BEV-FSL treated for 7.5 min, it was possible to obtain 64.2 g·L<sup>-1</sup> in the SHF process and 64.1 g·L<sup>-1</sup> from the SHCF. As for BEV-FSL treated for 15 min, 56.9 g·L<sup>-1</sup> of lactic acid was obtained from the SHF process, 76.7 g·L<sup>-1</sup> in the SHCF process. Therefore, both fractions generated in the pre-treatment could be used for the production of lactic acid, revealing its potential for applications in biorefineries and highlighting the possibility of eliminating the washing step of the pre-treated substrate, reducing the operational cost of the process.

Keywords: Sugarcane bagasse. Steam explosion. Enzymatic hydrolysis. Fermentation. Lactic acid.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da estrutura química da celulose mostrando ligações de hidrogênio intra e intermoleculares .....	5
Figura 2. Representação da estrutura química dos principais componentes das hemiceluloses.....	6
Figura 3. Representação da estrutura química de uma cadeia de xilana.....	7
Figura 4. Representação das principais unidades e ligações encontrada da lignina do bagaço de cana.....	8
Figura 5. Representação dos estereoisômeros do ácido láctico .....	10
Figura 6. Representação da sequência de reação proposta para a etapa de isomerização da glucose com hidroxila em posição equatorial .....	15
Figura 7. Representação da sequência de reação proposta para a etapa de desidratação da frutose e respectiva formação de HMF .....	16
Figura 8. Fotos do material sob as várias etapas de processamento .....	34
Figura 9. Aspecto das amostras explodidas a vapor a 195 °C por 7.5 (A e B) e 15 min (C e D).....	38
Figura 10. Processo de destoxificação da fração BEV-FL (7,5 min) .....	43
Figura 11. Curvas de hidrólise enzimática dos substratos BEV-FSL nos experimentos do planejamento.....	45
Figura 12. Análise de Tukey dos experimentos de hidrólise realizados a partir do planejamento.....	46
Figura 13. Diagrama de Pareto para os modelos gerados a partir do material pré-tratados por 7,5 min .....	50
Figura 14. Diagrama de Pareto para os modelos gerados a partir do material pré-tratados por 15 min .....	51
Figura 15. Curvas de hidrólise enzimática resultantes do escalonamento realizado em reator Infors .....	52
Figura 16. Resultado do teste de Gram realizado nas cepas recebidas .....	54
Figura 17. Cromatograma da fração BEV-FLD (15 min) antes e após a fermentação .....	56
Figura 18. Cinética de fermentação das frações hidrossolúveis originadas nos pré-tratamentos .....	58

Figura 19. Cromatograma do hidrolisado enzimático antes e após a fermentação (SHF, 15 min).....	59
Figura 20. Cinética de fermentação das frações hidrossolúveis originadas no pré-tratamento e nos ensaios de hidrólise enzimática (7,5 min).....	61
Figura 21. Cinética de fermentação das frações hidrossolúveis originadas no pré-tratamento e nos ensaios de hidrólise enzimática (15 min).....	62
Figura 22. Cromatograma da fração líquida antes e depois dos processos de destoxificação e fermentação.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos de explosão.....	36
Tabela 2. Balanço de massas das explosões a vapor do bagaço de cana-de-açúcar, realizadas a 195 °C .....	37
Tabela 3. Composição química e recuperação de BEV-FSL .....	39
Tabela 4. Rendimento mássico da fração BEV-FSL .....	40
Tabela 5. Composição química ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) da fração BEV-FL .....	41
Tabela 6. Resultado do ensaio de caracterização do carvão ativado utilizado nos experimentos.....	42
Tabela 7. Teores encontrados nas frações BEV-FLB (bruta) e BEV-FLD (destoxificada) ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) .....	42
Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) dos modelos gerados a partir do planejamento dos experimentos de hidrólise enzimática do planejamento .....	49
Tabela 9. Resultados da fermentação das frações BEV-FLB e BEV-FLD .....	55
Tabela 10. Parâmetros cinéticos resultantes da fermentação das frações BEV-FLB e BEV-FLD .....	55
Tabela 11. Resultados obtidos na fermentação dos hidrolisados em processos SHF e SHCF (7,5 min) .....	59
Tabela 12. Parâmetros cinéticos da fermentação das frações BEV-FLB e BEV-FLD (7,5 min) .....	60
Tabela 13. Resultados obtidos na fermentação dos hidrolisados em processos SHF e SHCF (15 min) .....	63
Tabela 14. Parâmetros cinéticos da fermentação das frações BEV-FLB e BEV-FLD (15 min).....	63
Tabela 15. Teores de xilo-oligossacarídeos encontrados na fração BEV-FL ( 7.5 min) ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

ald: abaixo do limite de detecção

Ara: arabinose

ANOVA: Análise de variância

BEV: Bagaço de cana explodido a vapor

BEV-AL: Bagaço de cana explodido a vapor: água de lavagem

BEV-FL: Bagaço de cana explodido a vapor – fração líquida

BEV-FS: Bagaço de cana explodido a vapor – fração sólida

BEV-FLB: Bagaço de cana explodido a vapor – fração líquida bruta

BEV-FLD: Bagaço de cana explodido a vapor – fração líquida destoxificada

BEV-FSL: Bagaço de cana explodido a vapor – fração sólida lavada

BEV-FSC: Bagaço de cana explodido a vapor – fração sólida centrifugada

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

EqGlc: Equivalentes de glucose

FPU: Unidades de papel de filtro (do inglês, filter paper unit)

FSC: Fator de severidade combinada

GL: graus de liberdade

Glc: glucose

HMF: 5-(hidroximetil)-furfural

HPLC: Cromatografia a líquido de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

MQ: média dos quadrados

NREL: National Renewable Energy Laboratory

RID: detector por refratometria diferencial (do inglês *Refractometer Index Detector*)

R<sub>M</sub>: Rendimento mássico

SQ: soma dos quadrados

Y<sub>(x/s)</sub>: rendimento de substrato em células

Y<sub>(p/s)</sub>: conversão de substrato em ácido láctico

P: produtividade em ácido láctico

DO<sub>600</sub>: densidade ótica medida em 600 nm

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1	BIOMASSA, BIOECONOMIA E BIORREFINARIAS .....	3
2.2	CANA-DE-AÇÚCAR E SEUS COMPONENTES ESTRUTURAIS .....	4
2.2.1	Celulose.....	5
2.2.2	Hemicelulose .....	6
2.2.3	Lignina .....	8
2.2.4	Componentes químicos não-estruturais ou secundários .....	9
2.3	ÁCIDO LÁTICO .....	9
2.4	ÁCIDO LÁTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO .....	11
2.5	Pré-tratamento.....	13
2.5.1	Inibidores e Destoxificação .....	18
2.6	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	19
2.7	FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE AL .....	20
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1	MATERIAL.....	24
4.2	MÉTODOS .....	24
4.2.1	Caracterização da Biomassa .....	24
4.2.2	Explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar .....	25
4.2.3	Ensaio de destoxificação .....	27
4.2.4	Hidrólise Enzimática .....	28
4.2.5	Ensaio Microbiológicos .....	29
4.2.5.1	Ativação da cepa .....	29
4.2.5.2	Coloração de Gram .....	30
4.2.5.3	Atividade catalásica .....	30
4.2.5.4	Preparo do Inóculo .....	30
4.2.6	Fermentação dos hidrolisados.....	30
4.2.6.1	Massa e Concentração Celular .....	31
4.2.6.2	Determinação da velocidade específica máxima do crescimento celular .....	32

4.2.6.3	Determinação do fator de conversão de substrato em células .....	32
4.2.6.4	Fator de conversão de substrato em ácido láctico .....	32
4.2.6.5	Produtividade.....	33
4.2.7	Análise estatística.....	33
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA .....	35
5.2	EXPLOSÃO A VAPOR .....	36
5.3	ENSAIOS DE DESTOXIFICAÇÃO POR ADSORÇÃO EM CARVÃO ATIVADO.....	42
5.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	44
5.5	FERMENTAÇÃO .....	53
5.5.1	Fermentação da fração hidrossolúvel do pré-tratamento .....	54
5.5.2	Experimentos de fermentação SHF e SHCF .....	58
<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>84</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria petroquímica tem sido a principal fonte de produtos químicos e de energia desde a metade do século XIX (MORA-VILLALOBOS *et al.*, 2020). Portanto, a bioeconomia um paradigma emergente que afeta diretamente o desenvolvimento e a revitalização dos sistemas econômicos no mundo todo. Essa estratégia se baseia no uso sustentável e equilibrado de recursos naturais, sendo construídas pontes entre a biotecnologia e a economia, bem como entre ciência, indústria e sociedade (AGUILAR; TWARDOWSKI; WOHLGEMUTH, 2019). Nesse sentido, dadas as incertezas relativas ao uso de combustível fóssil, bem como a ampla preocupação mundial com sustentabilidade e proteção ambiental, a busca pelo uso de fontes renováveis para a produção de energia, materiais e produtos químicos tem aumentado significativamente (DRAGONE *et al.*, 2020; VIEIRA *et al.*, 2020).

Dentre as matérias-primas renováveis para a produção de insumos químicos estão os resíduos de atividades agrícolas (forragens, palhiços, grãos e sementes desclassificados), agroindustriais (cascas de cereais, farelo e torta de oleaginosas, bagaços) e agroflorestais (cavacos, serragem e cascas), além de outros materiais residuais como lixo sólido urbano e outras correntes industriais (HOANG *et al.*, 2021; OKOLIE *et al.*, 2021). A utilização desses resíduos possibilita o aumento da produtividade obtida a partir de uma mesma área de plantio sem competir com a produção de alimentos (ROSILLO-CALLE, 2010).

O Brasil, na condição de maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tem produção estimada em 642,1 milhões de toneladas para a safra 2020/2021 (CONAB, 2020). Ressalta-se, porém, que a produção de etanol e açúcar gera quantidades significativas de resíduos lignocelulósicos que somam aproximadamente 140 kg de bagaço (base seca) e a mesma quantidade de palha por tonelada de cana processada (CANILHA *et al.*, 2012; PIPPO *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2021).

Com o avanço nos conceitos de bioeconomia e biorrefinarias, tem-se incentivado a utilização de resíduos lignocelulósicos para a produção de uma grande variedade de bens de consumo (GONZÁLEZ *et al.*, 2007). Nesse contexto, o bagaço de cana-de-açúcar (BC) é identificado como uma das principais matérias-primas de maior potencial para a produção de biocombustíveis e produtos químicos de alto valor agregado (PEREIRA *et al.*, 2015) como o ácido lático (AL) (VAN DER POL *et al.*,



2016a), cujo mercado tem previsão de alcançar a marca de 8.77 bilhões de dólares em 2025.

A maior parte do AL produzido no mundo é obtida por processos fermentativos empregando glucose e sacarose como substratos (MORA-VILLALOBOS *et al.*, 2020). Em termos de aplicações a que é destinado, a porção mais importante se refere à produção de poli(ácido láctico) (PLA, do inglês *polylactic acid*), cuja participação é de mais de 27% na receita total e de 35,7% na indústria de embalagens (GRAND VIEW RESEARCH, 2020). De acordo com o Portal Comex Stat do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços, utilizando a Nomenclatura Comum do Mercosul (29181100), as exportações brasileiras de AL totalizaram US\$ 22.123.286,00 em 2018, US\$ 23.904.308,00 em 2019 e US\$ 19.768.444,00 em 2020. Já as importações totalizaram US\$ 10.923.260,00 no ano de 2018, US\$ 13.460.538,00 em 2019 e US\$ 11.785.053,00 em 2020 (COMEX STAT, 2020), dados que demonstram o impacto desse produto no setor industrial do país. Ainda é importante destacar que custo da matéria-prima para a produção de AL na indústria pode chegar perto de 50% do valor total do custo de produção (AKERBERG; ZACCHI, 2000; SIKDER *et al.*, 2012; PARRA-RAMÍREZ *et al.*, 2018). Sendo assim, a utilização de resíduos agroindustriais para a produção do ácido láctico poderia impactar positivamente na diminuição do custo final do produto (NAMPOOTHIRI *et al.*, 2010; AHMAD *et al.*, 2020).

A produção do AL a partir de resíduos agroindustriais envolve principalmente as etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e recuperação e purificação do produto (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2011). O processo de pré-tratamento é necessário devido à estrutura complexa e recalcitrante da biomassa lignocelulósica, que representa uma barreira à eficiência do processo de hidrólise enzimática (SUBHEDAR; GOGATE, 2013). Assim, o pré-tratamento é etapa essencial para a conversão de polissacarídeos em açúcares simples por provocar mudanças na estrutura da biomassa, facilitando assim a acessibilidade das enzimas ao substrato (BORAND; KARAOSMANOĞLU, 2018). Outro fator que impacta na rentabilidade do processo é o aproveitamento das hemiceluloses, que varia de acordo com o tipo de pré-tratamento empregado, bem como a fonte vegetal de onde é obtida (VAN MARIS *et al.*, 2006). Desta forma, é importante recuperar essa fração e aproveitá-la para aumentar a eficiência e melhorar a economia do processo de produção (LORA; VENTURINI, 2012). No entanto, para que isso ocorra, faz-se necessário empregar

microrganismos capazes de fermentar pentoses e hexoses indistintamente (CUNHA-PEREIRA *et al.*, 2017).

O presente trabalho teve como objetivo o aproveitamento do bagaço de cana para a produção do AL, utilizando, para isso, o pré-tratamento da biomassa por explosão a vapor, seguido da hidrólise enzimática da fração sólida (fibrosa) e da cofermentação dos hidrolisados obtidos em ambas as etapas, sendo que a presença de inibidores de fermentação foi contornada por destoxificação do hidrolisado hemicelulósico (fração C5) por adsorção física em carvão ativado. A fermentação foi realizada através do microrganismo *Bacillus coagulans* DSM2314, cepa bacteriana capaz de fermentar pentoses e hexoses.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 BIOMASSA, BIOECONOMIA E BIORREFINARIAS

As atividades industriais, agrícolas e florestais geram altos volumes de biomassa vegetal e esses resíduos têm seu valor econômico maximizado a partir de sua conversão em biomateriais de interesse industrial. Sendo uma abundante fonte de polissacarídeos, a biomassa vegetal é uma matéria prima de grande potencial para a produção de biocombustíveis, energia e produtos químicos de elevado valor agregado (SUN; CHENG, 2002; ATELGE *et al.*, 2020). A demanda no setor de produtos químicos tem aumentado o consumo de fontes de energia fósseis e água potável, mas há como enfrentar este desafio de forma sustentável, através do aumento da eficiência dos processos já existentes e a substituição de fontes de energia de combustíveis fósseis por cadeias alternativas de produção, envolvendo o uso de recursos renováveis, tais como a biomassa (ZILBERMAN, 2013; GOLBERG *et al.*, 2013). Nesse sentido, as biorrefinarias desempenham um papel fundamental como sistemas de conversão desses recursos (COMO *et al.*, 2017; CHANDRA *et al.*, 2018). O termo biorrefinaria se refere, de forma geral, a uma planta industrial de processamento que utiliza processos e equipamentos altamente integrados, possibilitando o reaproveitamento de resíduos orgânicos e impulsionando um modelo de bioeconomia mais acessível (KAMM; GRUBER; KAMM, 2006; ATELGE *et al.*, 2020).

A bioeconomia – que compreende a parte da economia que utiliza recursos renováveis para a produção de bioenergia, biocombustíveis e bioprodutos – representa uma alternativa aos riscos e limitações do modelo econômico atual, baseado em recursos fósseis, e pode impactar positivamente no desenvolvimento do Brasil por criar oportunidades para inovação, geração de emprego e renda e crescimento econômico sustentável (KAMM; GRUBER; KAMM, 2006).

## 2.2 CANA-DE-AÇÚCAR E SEUS COMPONENTES ESTRUTURAIS

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene, do gênero *Saccharum*, pertencente à família *Poaceae*. Há pelo menos seis espécies do gênero, sendo a mais cultivada no Brasil um híbrido derivado de cruzamentos entre *Saccharum officinarum* L., caracterizado por acumular sacarose, e *Saccharum spontaneum* L., que apresenta resistência a doenças e altas taxas crescimento em biomassa. Trata-se de uma planta de até 6 m de altura, fina, de formato cilíndrico e com folhas grandes e largas, que é cultivada em locais de clima tropical ou subtropical, podendo também se desenvolver em solos pobres em micronutrientes. Vários relatos sugerem que a cana-de-açúcar seja originária da Nova Guiné, de onde se espalhou pelo mundo até chegar ao Brasil em 1520, provavelmente com os portugueses, e se tornar um dos mais importantes cultivos desenvolvidos no país (D'HONT *et al.*, 1998; IRVINE, 1999; GRIVET; ARRUDA 2002; VICENTINI *et al.*, 2012). A partir dela são obtidos dois produtos essenciais para a economia mundial: o açúcar (sacarose), parte indispensável da alimentação humana, e o etanol, utilizado para consumo em bebidas alcoólicas, como solvente polar para as mais diversas aplicações e como biocombustível (CONAB, 2020).

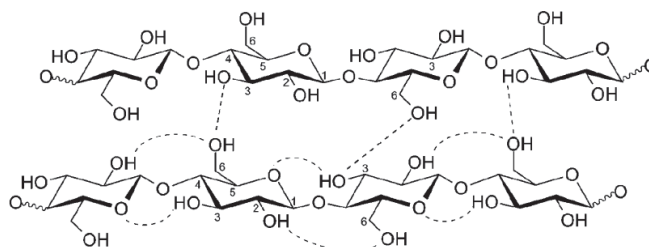
A biomassa vegetal produzida a cada ano é essencial para o funcionamento das sociedades industriais e crítico para o desenvolvimento de uma economia global sustentável (OLIVA *et al.*, 2021), dado o seu variado espectro de possibilidades para uso em biorrefinarias. Sua composição é formada majoritariamente por celulose, hemiceluloses e lignina (ZHENG *et al.*, 2017) e as relações entre seus fatores estruturais e composicionais refletem na suscetibilidade com que podem ser aproveitados em diferentes processos de conversão. Por exemplo, a presença de lignina na biomassa e sua associação com os polissacarídeos da parede celular

tornam a sua estrutura altamente recalcitrante, ou seja, resistente ao ataque de agentes químicos e biológicos (SINGH *et al.*, 2018; ZABED *et al.*, 2016).

### 2.2.1 Celulose

A celulose (FIGURA 1) é um homopolissacarídeo linear constituído por unidades de D-glucose unidas por ligações  $\beta$  do tipo (1,4), cuja unidade conformacional é representado pelo dissacarídeo celobiose, 4-O-( $\beta$ -D-glucopiranosil-D-glucopiranosose). Trata-se do principal componente da parede celular vegetal, onde exerce função estrutural (BUNTERNGSOOK *et al.*, 2018). O anel da  $\beta$ -D-glucopiranosose apresenta todos os grupos hidroxilas ligados em posição equatorial e as posições axiais são ocupadas por hidrogênios que apresentam menor efeito estérico, fato que explica a maior estabilidade desse enantiômero. A rede de ligações de hidrogênio intra e intermolecular entre as cadeias de celulose, lhe confere alta estabilidade e resistência à tração, sendo o comprimento da cadeia variável, dependendo do tipo e estágio de desenvolvimento maturacional do vegetal (LI *et al.*, 2010).

Figura 1. Representação da estrutura química da celulose mostrando ligações de hidrogênio intra e intermoleculares



FONTE: Pinkert *et al.* (2010).

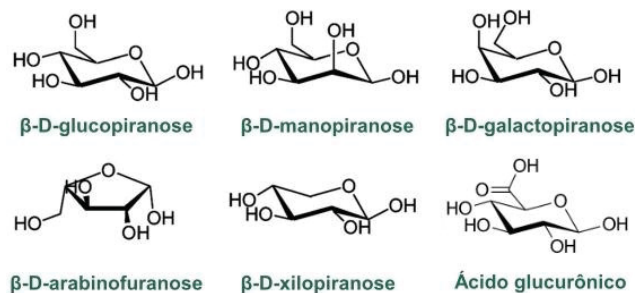
O comprimento da cadeia de celulose é normalmente expresso a partir de seu grau de polimerização (GP), ou seja, o número de resíduos D-glucopiranosil (anidrogucose) presentes em uma única cadeia (FENGEL e WEGENER, 1989). As cadeias de celulose podem apresentar morfologia cristalina, marcada por uma ordem molecular que a torna insolúvel em água, solventes orgânicos e soluções diluídas de ácidos e bases, e a amorfa, porção mais suscetível à hidrólise dada sua maior área superficial e facilidade de penetração de moléculas de água em seu interior (LEVIN, 1998; ZABED *et al.*, 2016). A celulose de ocorrência natural é denominada celulose I, que possui dois alomorfos, I $\alpha$  e I $\beta$ . A celulose I $\alpha$  é a forma dominante em organismos

primitivos como bactérias e algas, enquanto a celulose I $\beta$  é dominante nas plantas superiores (SULLIVAN, 1997). A existência e a quantificação dessas duas formas, foi estabelecida por técnicas espectroscópicas, enquanto suas estruturas reticuladas foram reveladas por técnicas de difração de raios X (VANDERHART; ATALLA, 1984; SUGIYAMA *et al.*, 1991). Por outro lado, embora não se dissolva em água, a celulose amorfa incha em suspensão aquosa, enquanto a celulose cristalina não apresenta essa tendência (CRANSTON; GRAY, 2010).

### 2.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos de cadeia ramificada constituídos de pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-manose, D-glucose, D-galactose) e ácidos urônicos (ácidos D-glucurônico e 4-O-metil-D-glucurônico) (FIGURA 2), que ocorrem como uma interface amorfa entre celulose e lignina na parede celular de plantas vasculares (ZABED *et al.*, 2016). Diferentes tipos de hemiceluloses existem em diferentes espécies vegetais, cuja função é a de estabilizar a parede celular por meio de ligações de hidrogênio com a celulose e de ligações covalentes com a lignina (WYMAN *et al.*, 2005).

Figura 2. Representação da estrutura química dos principais componentes das hemiceluloses

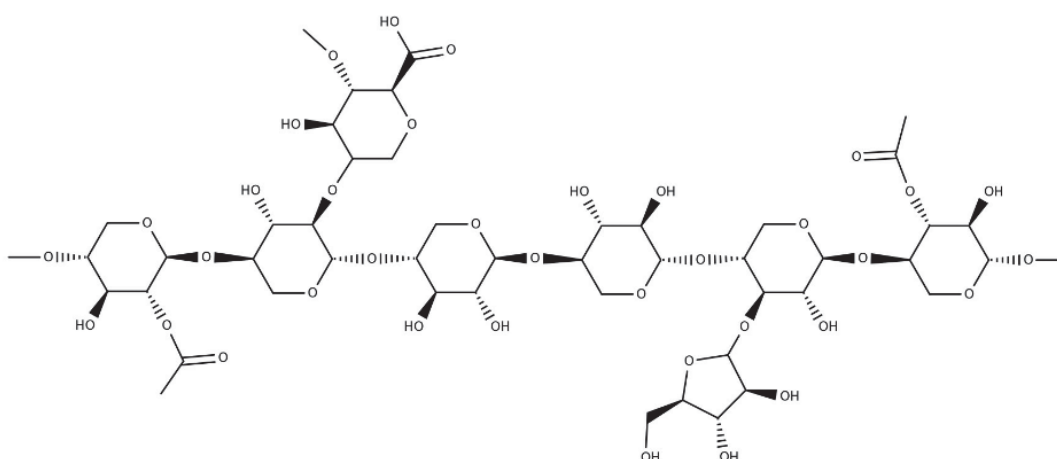


FONTE: Adaptado de Barhoum *et al.* (2020).

Tais heteropolissacarídeos são classificados de acordo com o tipo de carboidrato dominante na cadeia principal, dos quais pode-se identificar três grupos: xilanas, glucanas e mananas (HAZELWOOD; GILBERTE, 1993). As xilanas são os polissacarídeos mais abundantes em gramíneas como a cana-de-açúcar, apresentam uma cadeia linear composta de resíduos de D-xilose ligados por ligações glicosídicas  $\beta$  do tipo (1,4) parcialmente substituídos em O-2 e O-3 por resíduos de L-arabinose, ácidos D-glucurônico ou 4-O-metil-D-glucurônico, grupamentos acetil e derivados de

ácidos cinâmicos como os ácidos ferúlico e cumárico (GÍRIO *et al.*, 2010). Xilanas de diferentes tecidos vegetais podem ser diferenciadas pelos resíduos presentes em suas ramificações (MADEIRA JUNIOR *et al.*, 2017; ÁLVAREZ *et al.*, 2017), cujas propriedades determinam suas propriedades biológicas e seu uso na indústria (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2017). As xilanas (FIGURA 3), presentes no bagaço de cana como parte da fração hemicelulósica, apresentam em sua constituição unidades de xilose com substituições O-2, O-3 ou O-2 e O-3 arabinofuranosil. Os ácidos fenólicos, principalmente o ácido ferúlico, podem ser esterificados na posição 5-O das unidades de arabinose (DEMUTH; BETSCHART; NYSTRÖM, 2020).

Figura 3. Representação da estrutura química de uma cadeia de xilana



FONTE: Estrutura elaborada por Thiago Alexandre da Silva, 2021.

As hemiceluloses presentes em resíduos agrícolas, principalmente as xilanas, apresentam importante potencial econômico para várias aplicações industriais. Dentre essas estão a sua extração na forma de xilooligosacarídeos com aplicação química e farmacêutica e de monossacarídeos passíveis de fermentação em produtos de interesse comercial (MCKENDRY, 2002; BRIENZO, 2016; ZHANG *et al.*, 2016).

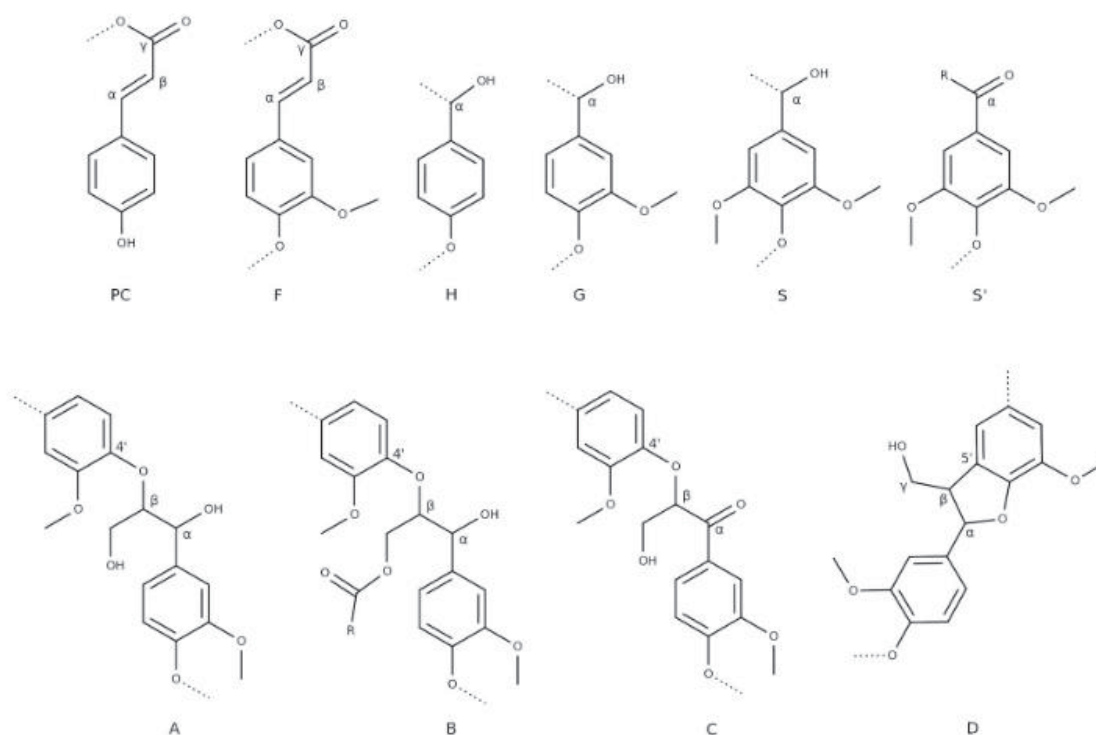
A remoção das hemiceluloses durante o estágio de pré-tratamento facilita a hidrólise enzimática da celulose, uma vez que essas podem se distribuir sobre a sua superfície e dificultar o reconhecimento e acesso das celulasas ao seu substrato natural. Além disso, devido à sua maior acessibilidade e reatividade, esses polissacarídeos podem ser fonte de produtos de degradação que atuam como inibidores do processo de fermentação, tais como furfural e hidroximetilfurfural (HMF). O acúmulo desses compostos na fração hidrossolúvel do pré-tratamento depende de

suas condições de operação, tais como temperatura, pressão, presença de um catalisador ácido exógeno e tempo de permanência do material no reator de explosão (AGBOR *et al.*, 2011; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

### 2.2.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula sintetizada naturalmente a partir da polimerização de unidades fenilpropanoides, denominadas  $C_6C_3$  ou simplesmente  $C_9$ , que ligadas de maneira irregular formam uma matriz polifenólica de alta complexidade estrutural (DEMIRBAS, 2008; ROMERO-GARCÍA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017). Os precursores mais importantes na formação da lignina são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, que graças à ação de lacases e peroxidases produzem radicais livres que reagem para formar vários tipos de ligações, principalmente C-O ou C-C, sendo predominante a ligação do tipo  $\beta$ -O-4 (FIGURA 4) (ZABED *et al.*, 2016). Esses três precursores não têm uma proporção fixa, variando de acordo com a espécie da planta, tipo de tecido e localização da lignina dentro da parede celular (ROMERO-GARCÍA *et al.*, 2016).

Figura 4. Representação das principais unidades e ligações encontrada da lignina do bagaço de cana



Legenda: PC, *p*-cumarato; FA, ferulato; H, *p*-hidroxifenila; G, guaiacila; S, siringila; S', unidades siringila oxidadas; A, ligação  $\beta$ -O-4; B, C e D, ligação  $\beta$ -O-4 com carbonos  $\alpha$  ou  $\gamma$  funcionalizados.

FONTE: Del Rio *et al.* (2015).

#### 2.2.4 Componentes químicos não-estruturais ou secundários

Componentes não estruturais são frações do material lignocelulósico que não pertencem à parede celular e contém várias substâncias como lipídeos, gomas e materiais resinosos. Trata-se de compostos de menor massa molar que podem ser solúveis em água ou em solventes orgânicos. Esta fração tem um interesse industrial significativo devido à presença de carboidratos como a sacarose, componentes antioxidantes como flavonoides e outros compostos fenólicos, ceras e materiais resinosos. No entanto, sua presença pode não ser atraente para bioprocessos devido ao eventual poder inibidor de alguns desses compostos sobre os organismos responsáveis pela fermentação (ROMERO-GARCÍA *et al.*, 2016).

Outras substâncias que não são comumente extraíveis com os agentes mencionados são os compostos inorgânicos (cinzas), as proteínas e substâncias pécticas. As pectinas, que estão presentes na parede celular em pequenas quantidades, são compostas por uma mistura de polissacarídeos cujo componente majoritário envolve unidades de ácido  $\alpha$ -D-galacturônico ligados por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$  (1,4) e, nesta cadeia principal, unidades de L-rhamnose são ocasionalmente inseridas através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1,4) e  $\beta$  (2,1). Substâncias pécticas podem ainda conter outros carboidratos substituintes como arabinose, fucose, galactose, glucose, manose e xilose (LEITÃO *et al.*, 1995). Em relação às cinzas do bagaço de cana, estas apresentam potássio, cálcio e magnésio em sua composição, e fósforo em menores teores. Além disso, contém outros elementos tais como cálcio e ferro, que são vitais para o crescimento das plantas (CORDEIRO; TOLEDO FILHO; FAIRBAIRN, 2009).

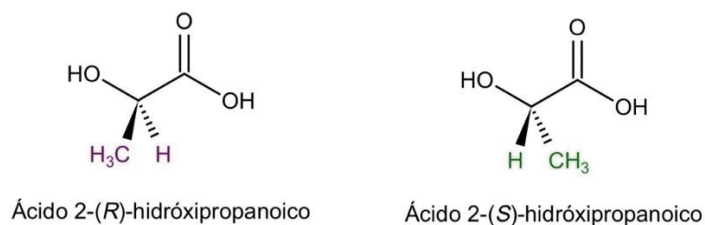
### 2.3 ÁCIDO LÁTICO

O ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ), ou ácido 2-hidróxiopropanóico, foi descoberto em 1780 pelo químico suíço chamado Scheele a partir do leite azedo, que tinha aspecto visual como o de um xarope marrom denominado “*Mjölkisyra*”. Em 1789, Lavoisier atribuiu a esse composto o nome de “*acide lactique*”, mas somente em 1857 Pasteur descobriu que o ácido láctico era o produto de um processo fermentativo. Esse ácido possui um centro assimétrico, caracterizado pela ligação de um átomo de carbono a uma carboxila (-COOH), um hidrogênio (-H), uma hidroxila (-OH) e uma metila (-CH<sub>3</sub>).



Portanto, essa molécula possui dois enantiômeros ou isômeros espaciais. Os descritos D e L ainda são utilizados na literatura para identificar essas duas formas devido a fatores históricos (GHAFAR *et al.*, 2014). Todavia, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (do Inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) ressalta que os descritores D (dextrógiro) e L (levógiro) devem ser utilizados somente para atividade óptica, e estes, comumente empregados em biologia, ainda permanecem para a nomenclatura de carboidratos e aminoácidos (VERT *et al.*, 2019). As nomenclaturas corretas devem estar baseadas no conceito R e S proposto por Cahn, Ingold e Prelog, que levam em consideração a prioridade dos grupos ligados ao centro estereogênico (FIGURA 5). Já as designações (+) ou (-), que indicam a rotação da luz polarizada que incide sobre essas moléculas, apesar de comuns em biotecnologia, não são recomendadas como complemento nominal pois podem ser mal interpretadas, visto que os sinais de rotação dependem também da temperatura, do solvente e do comprimento de onda utilizados para efetuar a medida (VERT *et al.*, 2019).

Figura 5. Representação dos estereoisômeros do ácido láctico



FONTE: O autor, 2021.

O AL pode ser obtido tanto pela via fermentativa quanto pela síntese química (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; WEE *et al.*, 2006). O único processo químico na fabricação industrial deste hidróxiácido é o da hidrólise da lactonitrila (MILLÁN *et al.*, 2019). A obtenção da lactonitrila se dá através da adição nucleofílica de ácido cianídrico ao etanal (acetaldeído). Nessa reação, o par de elétrons do orbital molecular ocupado mais alto (HOMO, do inglês *highest occupied molecular orbital*) do nucleófilo (cianeto) move-se para o orbital  $\pi^*$  antiligante (LUMO, do inglês *lowest energy unoccupied molecular orbital*) do eletrófilo (carbonila), e os elétrons do orbital ligante  $\pi$  da carbonila movem-se para o átomo de oxigênio (NORTH, 1993). Posteriormente, a lactonitrila é hidrolisada em AL com HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, que

depois é esterificado com metanol para produzir o lactato de metila. Finalmente, o éster é removido e purificado por destilação para depois ser hidrolisado em AL, sendo o metanol reciclado para uma nova etapa de esterificação (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004). Nenhuma outra rota química para a produção de ácido láctico foi ampliada à escala industrial até o momento (IGLESIAS *et al.*, 2020). A natureza limitada dos recursos petroquímicos necessários à síntese química (WEE *et al.*, 2006), bem como a preocupação com questões ambientais (GHAFFAR *et al.*, 2014), são fatores que influenciam na identificação de processos alternativos.

A produção seletiva de apenas um estereoisômero no processo fermentativo (PAL *et al.*, 2009a) faz com que corresponda a 90% da produção industrial de ácido láctico (PAL *et al.*, 2009a; IGLESIAS *et al.*, 2020). Esse processo se dá através do uso de bactérias que podem transformar carboidratos em AL opticamente puro, sendo este então utilizado em alimentos, em aplicações médico-farmacêuticas e na produção de plásticos biodegradáveis (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004; REDDY *et al.*, 2008). A pureza óptica e a razão entre as quantidades dos dois estereoisômeros influencia na qualidade final e nas propriedades do polímero (SODEGARD; STOLT, 2002), sendo que, na maioria dos casos, o monômero L(+) o mais utilizado nesse segmento da indústria (PAL *et al.*, 2009).

O ácido L-láctico é a forma comercial mais abundante porque o organismo humano está adaptado para assimilar a forma L. Além disso, ao ser polimerizado, resulta em um polímero (PLA) com propriedades adequadas à produção de fibras e filmes poliméricos (CONNOLLY *et al.*, 2005; SÖDERGARD; STOLT, 2002). Considerando o fato de ser um biopolímero renovável, biodegradável e biocompatível, a produção industrial de PLA tem crescido mundialmente (GUPTA *et al.*, 2007; RASAL *et al.*, 2010; MCKEOWN; JONES, 2020).

## 2.4 ÁCIDO LÁCTICO DE SEGUNDA GERAÇÃO

Atualmente, a maior parte da produção industrial mundial do ácido láctico utiliza bactérias e essas podem realizar a fermentação pela via homofermentativa ou pela via heterofermentativa (KRISHNA *et al.*, 2018), sendo esta segunda evitada, pois além de produzir pouco ácido láctico, também gera outros subprodutos. Assim, o caminho homofermentativo é o ideal para produção em escala comercial (KRISHNA *et al.*, 2018; ABDEL-RHAMAN *et al.*, 2013).

Os principais carboidratos utilizados nos processos fermentativos são a glucose, frutose, sacarose, xilose e arabinose. A via homofermentativa das pentoses segue a via glicolítica (caminho pentose-fosfato) para produzir AL na forma de lactato (TAN *et al.*, 2017). Na via pentose-fosfato, xilose e arabinose são convertidas por enzimas à xilulose 5-fosfato, que é clivada em gliceraldeído 3-fosfato (GAP). GAP é convertido em piruvato, que por sua vez, é convertido em ácido láctico (WANG *et al.*, 2015), cujo rendimento teórico é de  $1,67 \text{ mol mol}^{-1}$  (ABDEL-RHAMAN *et al.*, 2013). Já a homofermentação de hexoses segue o caminho Embden-Meyerhof-Pernas (EMP) (TAN *et al.*, 2017). Na via EMP, a hexose é metabolizada em glucose-6-fosfato pela enzima hexoquinase e, posteriormente, em frutose-6-fosfato. Depois, outros intermediários são formados até que o AL seja produzido a partir do piruvato, cujo rendimento teórico é de  $2 \text{ mol mol}^{-1}$  (ABDEL-RHAMAN *et al.*, 2013).

Já no processo metabólico heterofermentativo, a via é a do fosfogliconato (PK pathway) (TAN *et al.*, 2017) que produz não apenas ácido láctico, mas também etanol, gás carbônico e ácido acético (GUO *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2017). Nessa via, o rendimento teórico é de  $1 \text{ mol mol}^{-1}$  tanto para as hexoses quanto para as pentoses (ABDEL-RHAMAN *et al.*, 2013) e o gás carbônico é proveniente da 6-fosfogluconato. Etanol e ácido acético são formados a partir do acetil fosfato formado na clivagem da xilulose 5-fosfato (TAN *et al.*, 2017).

Entre os gêneros que seguem a via homofermentativa estão os *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Enterococcus*, já pela via heterofermentativa os *Leuconostoc* e *Oenococcus*. Os *Lactobacillus* podem ser tanto heterofermentativos quanto homofermentativos, dependendo da espécie (ABDEL-RHAMAN *et al.*, 2013). Assim, a via heterofermentativa constitui um dos principais empecilhos na produção de ácido láctico, sendo importante a escolha do microrganismo ideal para a fermentação para evitar a formação de subprodutos indesejados.

As bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas, com morfologia de bastonetes, esporuladas e aeróbias em sua maioria (DUTTA *et al.*, 2011). O *Bacillus coagulans* é uma bactéria termofílica, ácido-tolerante, catalase positiva, sendo anaeróbica facultativa, não patogênica e produtora de AL. Esse microrganismo se desenvolve em temperaturas entre 15 e 60 °C e pH ideal na faixa de 4 a 5 (BERGEY; HOLT, 1994). Por produzir ácido láctico, algumas cepas de *B. coagulans* foram erroneamente classificadas como *Lactobacillus sporogenes* (DUTTA *et al.*, 2011). Todavia, estudos taxonômicos demonstraram que essa espécie deve ser classificada

como pertencente ao gênero *Bacillus* (DRAGO; VECCHI, 2009). Uma vez que o *Bacillus coagulans* exibe características típicas de ambos os gêneros, *Lactobacillus* e *Bacillus*, sua posição taxonômica foi oficialmente transferida para o gênero *Bacillus* utilizando-se aspectos genéticos como critério para distinguir gêneros morfológicamente similares com características fisiológicas e bioquímicas parecidas (BERGEY; HOLT, 1994).

A produção de ácido láctico a partir de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar pode ser dividida em quatro etapas de desenvolvimento e otimização de processos: (a) o pré-tratamento do material lignocelulósico por métodos físicos e químicos ou pela combinação de ambos, para o fracionamento dos principais componentes da biomassa; (b) a hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados, para maximizar a liberação de pentoses e hexoses; (c) a fermentação láctica, para a conversão de pentoses e hexoses em alto rendimento; e (d) a separação e purificação do produto, para recuperá-lo quantitativamente com pureza compatível às exigências do mercado (RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011). Além disso, a etapa de fermentação pode ser precedida por uma estratégia de destoxificação da fração hidrossolúvel do pré-tratamento, de modo a minimizar a presença de inibidores e aumentar o rendimento global do processo no sentido da formação de AL (CARDONA; SANCHEZ, 2007; KUHAD *et al.*, 2011).

## 2.5 Pré-tratamento

Diferentes técnicas de pré-tratamento são utilizadas para a desconstrução da estrutura da parede celular vegetal e estas podem ser classificadas em biológicas, físicas e químicas (KUMAR *et al.*, 2009). A seleção de uma técnica em detrimento a outras depende do tipo de material lignocelulósico a ser processado, do objetivo final do processo de conversão, da possível geração de compostos inibitórios às etapas de hidrólise e fermentação, da economicidade do processo e de seu impacto ambiental (SUBHEDAR; GOGATE, 2013; SINGH *et al.*, 2018).

As técnicas mais comumente empregadas para o pré-tratamento da biomassa envolvem hidrólise ácida, hidrólise alcalina, explosão a vapor, extração por amônia líquida, extração por água quente, oxidação úmida, hidrotermólise (ou auto-hidrólise) e extração por solventes orgânicos (ADSUL *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2015). O pré-tratamento prepara a celulose para a hidrólise enzimática, uma vez que hemiceluloses e lignina são parcialmente hidrolisadas, deixando o componente

celulósico mais suscetível à hidrólise (MONTIPÓ *et al.*, 2018; TABIL; ADAPA; KASHANINEJAD, 2011).

Entre os diversos tipos de pré-tratamentos desenvolvidos até o momento, a explosão a vapor tem sido considerada um dos mais eficientes para aplicação industrial (RAMOS, 2003). Essa técnica envolve o tratamento da biomassa com vapor saturado a altas temperaturas, seguido por uma descompressão explosiva que resulta na desagregação parcial da matriz lignocelulósica, na hidrólise parcial das hemiceluloses, na modificação química e redistribuição de lignina e no aumento da acessibilidade da celulose à hidrólise (AUXENFANS *et al.*, 2017).

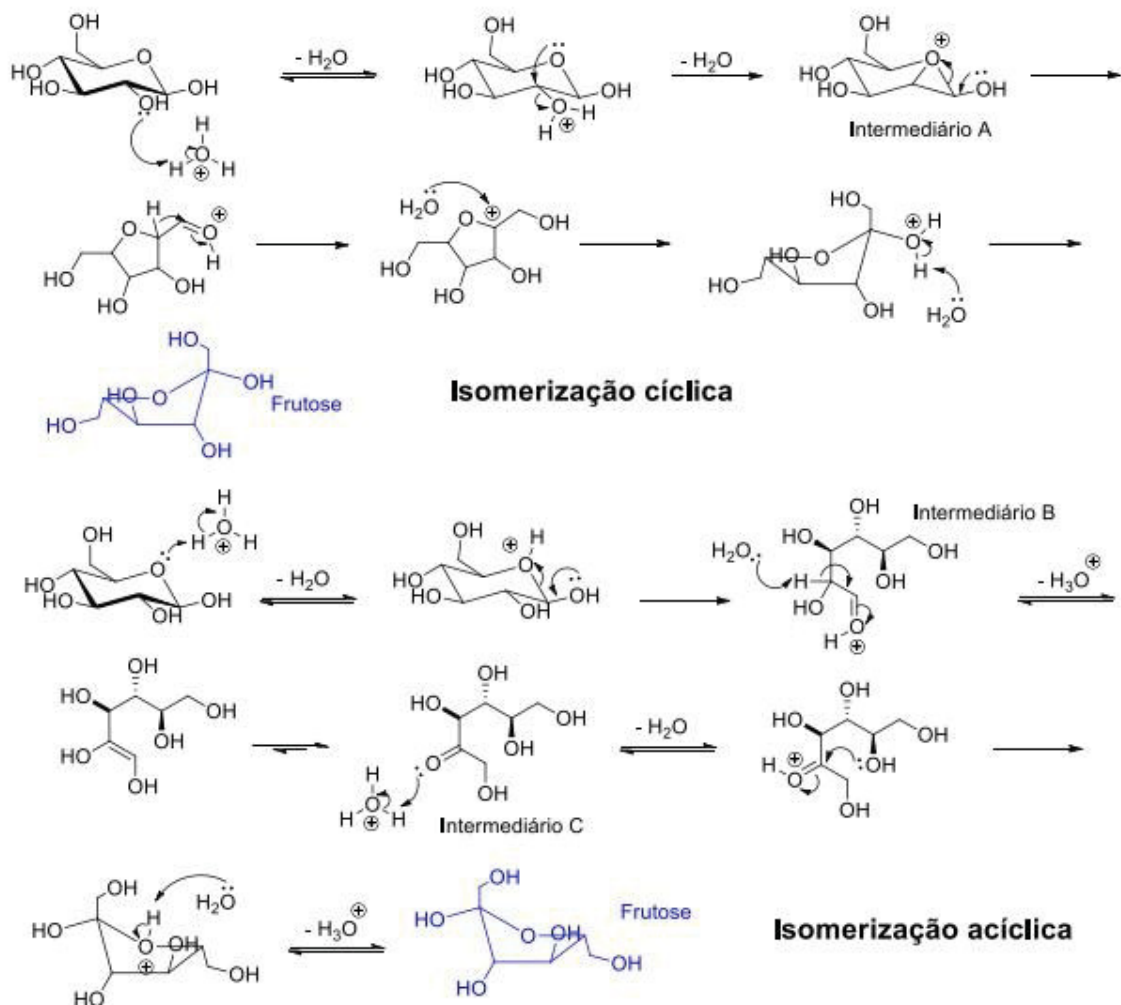
Durante a explosão a vapor, não há somente a geração de monossacarídeos, mas também oligômeros, além de subprodutos como HMF, furfural, ácido levulínico e ácido fórmico que são formados pela desidratação e oxidação de pentoses e hexoses. Em relação à lignina, a degradação de parte de sua estrutura libera ácidos fenólicos na fração solúvel, sendo que as reações de hidrólise ocorrem basicamente pela quebra de ligações aril éter dos tipos  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4 existentes em sua estrutura (RAMOS, 2003; PITARELO, 2013). Os compostos furânicos gerados tendem a inibir o desempenho ideal de enzimas (THOMSEN *et al.*, 2009) e os microrganismos (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Existem na literatura propostas para elucidação do mecanismo de desidratação das hexoses que apontam para a ocorrência de intermediários cíclicos ou de reações de abertura de anel (STÅHLBERG; SØRENSEN; RIISAGER, 2010). A isomerização da glucose em frutose é uma etapa essencial que consta nas principais propostas de mecanismo para a formação do HMF (ZHANG; HEWETSON; MOSIER, 2015). Ainda de acordo com a literatura, a etapa de isomerização pode ser descrita por mecanismos cíclico ou acíclico (FIGURA 6).

O anel piranosídico da D-glucose é estável e não apresenta tensão de anel dado ao fato de que todas as suas hidroxilas estão em posição equatorial. Já no anel furanosídico da frutose, a tensão angular do anel e a orientação espacial dos ligantes conferem menor estabilidade conformacional à molécula (ZHANG; ZHANG; SU, 2015). Por isso, a conversão de glucose em frutose é a etapa determinante no processo de desidratação para a formação de HMF. Na isomerização cíclica, o mecanismo se inicia a partir da protonação da hidroxila do carbono 2. A seguir, o par de elétrons não ligantes do oxigênio hemiacetalico ataca o carbono onde a hidroxila está protonada, provocando a saída dela na forma de água. Com a saída dessa

molécula de água, há a formação de um intermediário cíclico altamente reativo (Intermediário A). Depois, um par eletrônico da hidroxila anomérica é cedido para estabelecer uma ligação dupla com o carbono anomérico, causando a abertura do ciclo de três membros. Essa etapa leva à transformação do anel de seis para um anel de cinco membros e, a partir de sua formação e do ataque da água no carbocátion gerado, tem-se a formação da estrutura da frutose.

Figura 6. Representação da sequência de reação proposta para a etapa de isomerização da glicose com hidroxila em posição equatorial

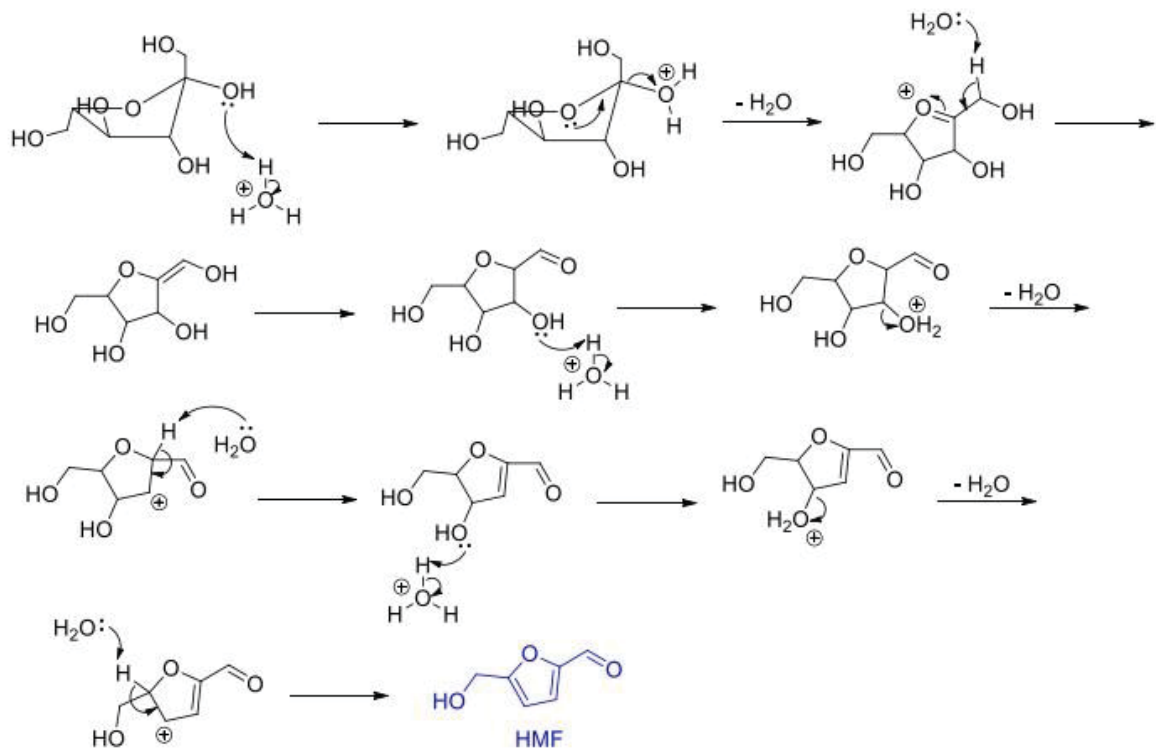


FONTE: Gomes (2016) *apud* Rasmussen *et al.* (2014)

Já a isomerização acíclica inicia-se pela protonação do oxigênio hemiacetal do carboidrato e a formação de uma ligação dupla entre o carbono e a hidroxila anomérica (Intermediário B), ocasionando assim a abertura do anel. Na cadeia aberta ocorre uma etapa de enolização, processo em que há a remoção de um próton ligado

ao carbono  $\alpha$  no tautômero carbonilado, havendo a formação de um ânion com dois contribuintes de ressonância denominado enolato, com a formação de um grupo carbonila no carbono 2 (Intermediário C), seguido da protonação desse. Posteriormente ocorre o ataque da hidroxila do carbono 5 à carbonila protonada, fechando o anel, seguido da ação de uma molécula de água do meio que retira um hidrogênio ligado ao oxigênio carregado positivamente e, por fim, há a formação da estrutura da frutose. A eliminação sequencial de três moléculas de água resulta na formação do HMF, conforme representado na FIGURA 7 (DORNATH; FAN, 2014; TORRES; TSAPATIS; DAOUTIDIS, 2012).

Figura 7. Representação da sequência de reação proposta para a etapa de desidratação da frutose e respectiva formação de HMF



FONTE: Gomes (2016) *apud* Rasmussen *et al.* (2014)

Essa etapa é termodinamicamente favorável porque o composto intermediário (frutose) é mais estável que o produto, cuja estrutura aromática é estabilizada pelo sistema  $\pi$  ressonante. Assim, grande quantidade dos trabalhos descritos na literatura que envolvem a obtenção de HMF estão baseados na desidratação da frutose (DORNATH; FAN, 2014; TORRES; TSAPATIS; DAOUTIDIS, 2012).

O furfural é um derivado oriundo da desidratação de pentoses. A desidratação da xilose ocorre depois de uma etapa de isomerização, que pode ser descrita por mecanismos cíclicos ou acíclicos e levam à formação de xilulose. O mecanismo dessa isomerização se dá de forma análoga ao da glucose. (RASMUSSEN *et al.* 2014).

Embora essas propostas de mecanismo forneçam uma base importante para compreender como os produtos de degradação são formados e oferecer algumas pistas para prever quais produtos são prováveis de serem formados, os resultados não podem ser transferidos diretamente para misturas de reação complexas resultantes de pré-tratamento de biomassa (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Análises detalhadas de vários licores de biomassa pré-tratada revelaram a presença de uma grande variedade de compostos orgânicos, incluindo ácidos carboxílicos alifáticos e aromáticos, bem como uma série de aldeídos e cetonas além de HMF, furfural e outros derivados furânicos, cuja presença no meio pode interferir na rota preferencial de reação (efeito de matriz). Por isso, informações exatas sobre as rotas de formação desses compostos ainda não estão muito bem esclarecidas na literatura (RASMUSSEN *et al.*, 2014; MONSCHEIN *et al.*, 2016).

A formação desses compostos, que podem atuar como inibidores de hidrólise e fermentação, está ligada diretamente à severidade do pré-tratamento aplicado, o qual depende dos efeitos combinados de tempo, temperatura e força ácida presente no meio (MONSCHEIN *et al.*, 2016). Alterações como aumento da temperatura e/ou tempo de exposição da biomassa no reator de pré-tratamento favorecem as reações de hidrólise das hemiceluloses (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; RAMOS, 2003; PITARELO *et al.*, 2012).

Um cálculo do fator de severidade foi desenvolvido para combinar os principais parâmetros do processo de pré-tratamento e isto foi realizado através do modelo de Arrhenius descrito por Chornet e Overend (1991). O valor de log da ordenada de reação fornece o Fator de Severidade ( $\log R_0$ ) (Equação 1), em que  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) é a temperatura e  $t$  (min) é o tempo de residência do material no reator, que é utilizado para mapear os efeitos do pré-tratamento sobre a biomassa lignocelulósica (IROBA *et al.*, 2014). Posteriormente, o pH do meio foi inserido na equação para compensar a contribuição advinda do uso de catalisadores ácidos como os ácidos fosfórico e sulfúrico (Equação 2) (SHELL *et al.*, 2003). Este novo fator foi denominado Fator de Severidade Combinada (FSC).



$$\log R_o = e^{[(T-100)/14,75]}.t \quad (1)$$

$$\log R_o = \log_{10} (t \cdot \exp^{(T-TR)/14,75}) - \text{pH} \quad (2)$$

### 2.5.1 Inibidores e Destoxificação

A realização do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos pode induzir à produção de alguns componentes que afetam negativamente o processo fermentativo ou, mesmo, a hidrólise enzimática. Esses componentes, chamados de inibidores, precisam ser parcialmente ou totalmente removidos do material hidrolisado por meio de processos de destoxificação. A natureza e a concentração dos inibidores dependerão da matéria-prima, do tipo de pré-tratamento, do uso ou não de catalisadores exógenos e das condições operacionais do processo (ROMERO-GARCÍA *et al.*, 2016). Compostos que podem atuar como inibidores são encontrados no slurry resultante do pré-tratamento e estes são classificados em cinco categorias: frações de lignina quimicamente modificada, compostos fenólicos hidrossolúveis, aldeídos furânicos, açúcares e ácidos carboxílicos (KO *et al.*, 2015). Um estudo feito por Canilha *et al.* (2012) sugere ainda um grupo adicional de inibidores relacionados a metais liberados pela corrosão do equipamento, como cromo, cobre, ferro e níquel, resultado este que foi posteriormente confirmado por Jönsson, Alriksson e Nilvebrant (2013).

O estudo da atividade *in vitro* de várias enzimas de destaque no catabolismo, como hexoquinases, aldolases, fosfofrutoquinases, triosefosfato desidrogenases e álcool desidrogenases, apontou o furfural como o composto de maior inibição dentre os presentes no meio reacional (MODIG; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002). Além da ação sobre enzimas, Allen *et al.* (2010) demonstraram que o furfural induz a produção de espécies reativas de oxigênio na célula dos microrganismos, provocando danos às membranas das mitocôndrias e vacúolos. Já os compostos fenólicos são tóxicos à fermentação pela ação que têm sobre as membranas celulares, afetando sua integridade e seletividade (DUARTE *et al.*, 2005).

Considerando que hidrolisados lignocelulósicos podem conter diferentes tipos de inibidores e que os micro-organismos podem apresentar comportamento variável, várias medidas têm sido adotadas para minimizar a ação desses compostos sobre os microrganismos. Os principais métodos de destoxificação química até hoje utilizados envolvem o uso de resina de troca iônica fortemente ácida, neutralização, uso de carvão ativo e extração com solventes orgânicos (MUSSATO; ROBERTO, 2004).

Em um estudo desenvolvido por Klasson *et al.* (2013), a destoxificação do hidrolisado ácido dos resíduos industriais de depuração da massa não branqueada da indústria de papel celulose foi avaliada. Os autores demonstraram que a maioria dos inibidores pode ser removida em menos de 2 h utilizando adsorção por carvão ativado. Interessantemente, Nasidi *et al.* (2015) estudaram a melhoria na produção de etanol tendo sorgo como substrato e, após a etapa de hidrólise ácida das hemiceluloses, utilizaram para destoxificação uma combinação dos métodos de overliming e carvão ativado. O resultado do estudo mostrou que a remoção dos inibidores aumentou a produtividade de álcool em 25% em relação ao hidrolisado não destoxificado.

O uso de carvão ativado em hidrolisados pode reduzir a ação de inibidores por ter a capacidade de adsorver diferentes tipos de moléculas, que ficam presas em sua superfície devido às interações de *Van der Waals* (CARVALHO *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2013; SHAH; AHMAD; AHMAD, 2016), mostrando-se eficiente para a eliminação seletiva de compostos tóxicos sem afetar a concentração de açúcares passíveis de fermentação (LEE, 1997).

## 2.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Após o pré-tratamento é realizada a etapa de hidrólise, que pode ser realizada por via ácida ou enzimática (PENGILLY, 2013). A hidrólise ácida pode ser realizada em ácido diluído ou concentrado. O principal ácido utilizado nesse processo é o sulfúrico, embora os ácidos clorídrico, nítrico, fosfórico e trifluoroacético também já tenham sido testados (ZABED *et al.*, 2017). Ainda que a hidrólise com ácido concentrado apresente maiores rendimentos e menores problemas com a produção de inibidores, há a necessidade de equipamentos resistentes à corrosão para que não haja comprometimento da viabilidade econômica do processo (AUXENFANS *et al.*, 2017). Já a hidrólise com ácidos diluídos exige o uso de altas temperaturas para aumentar a velocidade de reação. Essa alteração de temperatura aumenta a taxa de degradação de açúcares e da lignina residual, resultando em uma maior formação de inibidores (ASSUMPÇÃO, 2015).

O processo de hidrólise deve ser realizado de forma economicamente viável e com o uso de tecnologias ambientalmente amigáveis. O Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL) dos Estados Unidos estimou que os custos associados ao processo enzimático podem ser até quatro vezes menores do que o processo baseado

em ácidos minerais diluídos devido ao uso de condições reacionais mais brandas (PENGILLY, 2013). No entanto, o alto custo de produção das enzimas ainda causa um importante impacto sobre a viabilidade econômica do processo.

As enzimas que constituem o complexo enzimático usado na hidrólise da celulose são as celobiohidrolases, as endo- $\beta$ -1,4-glucanases e as  $\beta$ -glucosidases. A hidrólise enzimática completa é feita pela ação sinérgica das enzimas que compõem esse complexo (SINGH *et al.*, 2018). As endoglucanases têm o papel de degradar as regiões menos cristalinas da celulose, mediante a clivagem randômica das ligações internas das cadeias presentes em regiões amorfas ou menos organizadas das microfibrilas, diminuindo o seu grau de polimerização e gerando novas extremidades livres (redutoras e não redutoras) no meio (TEERI, 1997).

As exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) agem nas regiões terminais das cadeias de celulose liberando majoritariamente celobiose, sendo capazes de gerar amorfogênese por também atuarem em regiões cristalinas (ZHANG *et al.*, 2006). Estas enzimas ainda são divididas em dois grupos. A CBH I hidrolisa unidades de celobiose das extremidades redutoras, enquanto a CBH II age nas extremidades não redutoras da cadeia (HEIDORNE *et al.*, 2006). Por sua vez, as  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21) atuam nos resíduos de celodextrina (grau de polimerização menor que 7) e celobiose, hidrolisando-os a glucose (ERIKSSON *et al.*, 2002). Neste estudo serão utilizadas as enzimas Cellic CTec3 (Novozymes), que contém atividades majoritariamente celulásica e  $\beta$ -glucosidásica, e Cellic HTec3, cuja atividade é majoritariamente hemicelulásica.

## 2.7 FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE AL

A fermentação pode ser conduzida das seguintes formas: descontínua (batelada), descontínua alimentada (batelada alimentada) e contínua, sendo esta última a mais utilizada industrialmente (FACCIOTTI, 2001). No processo descontínuo adiciona-se o meio de cultura (mosto ou hidrolisado) e o microrganismo responsável pelo processo. Ao final da fermentação, o caldo fermentado é retirado do reator para recuperação do produto e por isso há uma melhor condição de se manter a assepsia do processo (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

No processo descontínuo alimentado (batelada alimentada), o substrato é alimentado sob condições controladas até atingir o volume operacional do reator e a

vazão de alimentação pode ser constante ou variável (CARVALHO; SATO, 2001). Esse processo permite o controle da concentração de glucose, minimizando efeitos de inibição pelo substrato (VIEGAS, 2003). Finalmente, no processo contínuo há a alimentação constante de substrato e, paralelamente, a retirada do produto de fermentação, mantendo constante o volume de reação (FACCIOTTI, 2001).

O processo de hidrólise e fermentação em separado (do inglês *Separate Hydrolysis and Fermentation* – SHF) se realiza em duas etapas, sendo a biomassa lignocelulósica pré-tratada inicialmente convertida em unidades monoméricas por hidrólise enzimática, que é seguida pela fermentação desses monossacarídeos. Uma das principais vantagens desse processo é que as duas etapas são realizadas em suas condições ideais. No entanto, a principal desvantagem é a acumulação de açúcares que podem inibir as enzimas e comprometer o rendimento do processo (JAMBO *et al.*, 2016; VOHRA *et al.*, 2014).

No processo de hidrólise e fermentação simultâneas (do inglês *Simultaneous Saccharification and Fermentation* – SSF), a liberação de açúcares monoméricos e o seu consumo ocorrem no mesmo reator. Essa configuração, que praticamente elimina o problema de inibição das enzimas por acumulação de açúcares, é mais econômica por reduzir o número de equipamentos necessários ao processo de conversão. A principal desvantagem é que a hidrólise enzimática funciona melhor próximo a 50 °C, enquanto a fermentação opera idealmente entre 28 e 37 °C. Duas possíveis soluções para este problema seriam baixar a temperatura ótima das enzimas ou utilizar cepas termotolerantes, sendo mais viável, atualmente, a utilização de microrganismos que possam trabalhar em temperaturas próximas à da hidrólise (JAHNAVI *et al.*, 2017; MAITY, 2015; RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017).

A sacarificação e co-fermentação simultâneas (do inglês *Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation* - SSCF) orientam-se à assimilação de todos os carboidratos anteriormente liberados durante o pré-tratamento e a hidrólise enzimática, podendo ser levada a cabo através de um conjunto de microrganismos capazes de fermentar hexoses e pentoses separadamente, ou um único microrganismo capaz de fermentar ambas simultaneamente. Vantagens como baixo custo, menor tempo de operação, menor risco de contaminação, menos efeitos inibitórios e eliminação do problema de crescimento desigual no meio fazem com que o desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados ainda esteja em

grande evidência para aplicações dessa natureza, particularmente em nível industrial (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017).

Uma variação dos processos SSF e SSCF se dá pela realização de um estágio de pré-hidrólise ou pré-sacarificação. Nessa configuração há um estágio rápido de liquefação do meio, oferecendo condições mais adequadas para a fermentação e permitindo o alcance de maiores rendimentos em menor tempo. Esse processo é particularmente importante quando cargas elevadas de sólidos totais são utilizadas na hidrólise (FANG; QI, 2017). Comparada aos processos de SSF e SSCF, espera-se que a etapa de pré-hidrólise (pSSF e pSSCF) favoreça o processo fermentativo por disponibilizar uma fonte de carbono para crescimento microbiano desde o início do processo (SHEN; AGBLEVOR, 2010).

Os processos fermentativos envolvendo a produção do ácido lático apresentam como principal obstáculo a diferença entre a temperatura e o pH ideais para enzimas e bactérias, sendo então necessário o uso de microrganismos termotolerantes para esse processo (OU *et al.*, 2011). Os processos SHF e SSF, utilizando bactérias ácido lácticas, têm sido amplamente estudados na literatura (ABDEL-RHAMAN *et al.*, 2011; JAHNAVI *et al.*, 2017; MAITY, 2015; RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017). Porém, no caso do processo SSF, as culturas devem ser pré-adaptadas ao meio para que o processo fermentativo possa ser realizado em uma única etapa (VAN DER POL *et al.*, 2016a; AULITTO *et al.*, 2019).

Outro bioprocesso semelhante é o SHCF (do inglês *Separate Hydrolysis and Co-Fermentation*), que combina as vantagens do SHF e do SSCF. Ocorre em recipientes separados para que cada etapa pode ser realizada em suas condições ideais. Além disso, uma vez que nessa configuração os micro-organismos utilizam pentoses e hexoses simultaneamente, os rendimentos são normalmente superiores ao SHF. Já o bioprocessos consolidado, CBP (do inglês *Consolidated Bioprocessing*), combina simultaneamente hidrólise de biomassa, utilização de açúcares liberados e fermentação em um biorreator. Teoricamente, é energeticamente eficiente devido à redução de processos. Todavia, o problema crucial é desenvolver um organismo para combinar singularmente todos os recursos durante o processo (HARUN; LIU; DANQUAH, 2011).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes condições de hidrólise enzimática e fermentação para a produção de ácido láctico a partir de frações oriundas do bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor, e determinar, dentre elas, a que forneça maior rendimento mássico em relação ao tempo de processamento.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o bagaço de cana-de-açúcar em relação a sua composição química e determinar os balanços de massas das explosões a vapor realizadas a 195 °C;
- Investigar o efeito causado pelas diferentes condições de explosão a vapor e de lavagem aquosa dos substratos obtidos sobre a sua composição química e suscetibilidade à hidrólise enzimática;
- Investigar o efeito da remoção de inibidores presentes na fração hidrossolúvel do pré-tratamento sobre a fermentação (processo SHCF), utilizando adsorção em carvão ativado como método de destoxificação;
- Maximizar a produção de ácido láctico a partir dos hidrolisados derivados de substratos pré-tratados (processo SHF) empregando a bactéria *Bacillus coagulans* DSM2314, capaz de fermentar pentoses e hexoses;
- Determinar a produtividade em ácido láctico nas diferentes configurações de processo envolvidas nesse estudo, particularmente aquelas resultantes da co-fermentação de pentoses e hexoses produzidas a partir da explosão a vapor e hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi fornecido pela Raízen (Piracicaba, SP). Os demais reagentes empregados neste estudo possuíam grau analítico. Padrões cromatográficos foram adquiridos da Sigma Aldrich®. A preparação enzimática empregada no processo de hidrólise (Cellic® CTec3 e Cellic® HTec3) foi fornecida pela *Novozymes Latin America* (Araucária, PR) e a cepa bacteriana utilizada para a fermentação láctica foi *Bacillus coagulans* DSM2314, propriedade da empresa alemã DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, Brunsvique, Alemanha).

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Caracterização da Biomassa

Os ensaios de determinação da composição química foram realizados de acordo com as recomendações do Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL - *National Renewable Energy Laboratory*) dos Estados Unidos. A determinação da massa seca do material nativo e dos materiais pré-tratados foi realizada em balança de infravermelho a 105 °C até massa constante (NREL/TP-510-42621). A quantidade de cinzas foi determinada em mufla a 575 °C por 4 h, segundo o procedimento descrito por Sluiter *et al.* (2008b) (NREL/TP-510-42622).

A determinação da composição química dos materiais celulósicos teve início com o seu tratamento com ácido sulfúrico 72% ( $m \cdot v^{-1}$ ) por 1 h a 30 °C. Em seguida, o material foi diluído para uma concentração de 3% ( $m \cdot v^{-1}$ ) e condicionado a 121 °C por 1 h para posterior filtração em cadinho de vidro de porosidade média. O teor de lignina insolúvel em ácido foi determinado pela massa retida no cadinho e a lignina solúvel em ácido foi quantificada por espectroscopia no ultravioleta, utilizando os comprimentos de onda de 240 e 320 nm conforme Sluiter *et al.* (2008b) (NREL/TP-510-42618).

A composição em carboidratos dos substratos celulósicos foi determinada nos hidrolisados ácidos resultantes (filtrado) utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

em cromatógrafo Shimadzu modelo LC10AD. Esse sistema é provido de amostrador automático modelo SIL10A, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 10A e de detectores nos modelos RID10A para índice de refração e SPD-M10Avp para espectrofotometria no ultravioleta. A análise foi realizada em coluna Rezex RHM (Phenomenex, 300 x 7,8 mm) a 65 °C, precedida por pré-coluna Carbo H (Phenomenex, 8 x 3,2 mm) e eluída com fase móvel  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mmol·L<sup>-1</sup> a uma vazão de 0,6 mL·min<sup>-1</sup>. As quantificações foram efetuadas por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado (celobiose, glucose, xilose, arabinose e ácido acético), levando-se em conta seus respectivos fatores de hidrólise ácida, que serviram para converter cada componente em seu respectivo derivado anidro: 0,95 para a celobiose, 0,90 para a glucose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,98 para o ácido acético. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentados como médias dos pontos experimentais, acompanhados do erro padrão.

#### 4.2.2 Explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar

A explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em instalação própria localizada no campus do Centro Politécnico da UFPR. Adotou-se a condição de auto-hidrólise. Os ensaios foram realizados em um reator de aço inox com capacidade de 10 L, equipado com sensores para o controle da temperatura bem como tempo de reação. A injeção de vapor foi realizada em dois pontos da coluna do reator, mediante o emprego de válvulas de alta pressão, para proporcionar uma melhor homogeneidade no pré-tratamento, além de uma maior eficiência térmica. O reator estava acoplado a uma caldeira de alta pressão (Weco, modelo GVO 10/30, Porto Alegre, Brasil), fornecendo o vapor necessário, e a um compressor de ar para atuação das válvulas pneumáticas.

As condições reacionais adotadas foram baseadas nos estudos preliminares de Pitarelo *et al.* (2016), empregando a temperatura de 195 °C e tempos de reação de 7,5 e 15 minutos. Amostras contendo 1 kg de bagaço (base úmida) foram introduzidos no reator pré-aquecido. A válvula de esfera superior foi fechada e as válvulas de entrada do vapor foram imediatamente abertas. O aumento da temperatura foi acompanhado até atingir o valor desejado, dando início, neste ponto, a contagem do tempo de pré-tratamento (em torno de 45 segundos). Ao término do tempo de residência do material no reator, as válvulas de entrada de vapor foram



fechadas e a válvula de esfera inferior foi imediatamente aberta por meio de um atuador pneumático, promovendo assim a descompressão do material (explosão), que foi arrastado para o interior de um ciclone provido de um recipiente de aço inoxidável. Após a explosão, o material gerado no coletor foi identificado como bagaço de cana de açúcar explodido a vapor (BEV), tendo sido centrifugado para a separação das fibras pré-tratadas, originando uma fração sólida (BEV-FS) e uma fração líquida solúvel em água (BEV-FL).

BEV-FS foi dividida em duas partes, tendo sido uma delas lavada (BEV-FSL) e outra não (BEV-FSC). A lavagem do material pré-tratado a vapor foi realizada a um teor de sólidos totais de 5% ( $m \cdot v^{-1}$ ) por 1 h sob agitação mecânica (150 rpm), em temperatura ambiente, e esta suspensão foi centrifugada por 5 min. Em seguida cada material foi armazenado sob vácuo e refrigeração para análise da composição química, de acordo os métodos descritos anteriormente, e para utilização nos experimentos de hidrólise enzimática. A água resultante da lavagem foi nomeada água de lavagem (BEV-AL).

Os rendimentos mássicos dos materiais pré-tratados foram determinados por gravimetria, utilizando a diferença entre a massa seca do bagaço de cana que foi alocado no reator e a massa seca de substrato obtido após os pré-tratamentos. O teor de sólidos solúveis das BEV-FL foi determinado pelo procedimento descrito por SLUITER *et al.* (2008a) (NREL/TP-510-42621). O ensaio consistiu em adicionar alíquotas de 5 mL da amostra em recipientes tarados, os quais foram mantidos em 105 °C por 24 h. Após esse período, as massas obtidas foram utilizadas para determinar o rendimento mássico em relação à massa original.

A fração BEV-FL foi analisada no mesmo sistema cromatográfico descrito no item 4.2.1 para quantificação por padronização externa de ácido acético, 5-(hidroximetil)furfural e furfural. Além disso, realizou-se uma pós-hidrólise dessas frações com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 3% a 120 °C por 20 min segundo o método de Sluiter *et al.* (2008b) (NREL/TP-510-42623) para a conversão dos oligossacarídeos em monossacarídeos. Esses hidrolisados também foram analisados novamente nas mesmas condições cromatográficas para a quantificação por padronização externa de celobiose, glucose, xilose e arabinose. A análise dos oligossacarídeos presentes em BEV-FL foi realizada por cromatografia de íons em sistema Metrohm 850 (Herisau, Suíça), tendo como fase móvel NaOH 20 mM, coluna Thermo Carbopac PA100 e

detecção por amperometria pulsada. O preparo dos padrões foi realizado a partir de oligômeros de 2 a 6 unidades de xilose ligadas entre si.

#### 4.2.3 Ensaio de destoxificação

Para o ensaio de destoxificação, seguiu-se o modelo proposto por Nascimento (2019) com modificações. Amostras de 1 g do adsorvente carvão ativado comercial (Neon) foram colocadas em contato com 50 mL de BEV-FL. Após a mistura, os frascos foram submetidos à agitação de 200 rpm durante 5 min. Para a separação do adsorvente, no final dos experimentos as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm durante 5 min em centrífuga orbital da marca Eppendorf® modelo Centrifuge 5415 c (São Paulo, Brasil). Esse processo foi repetido por três vezes, perfazendo um gasto total de 3 g de carvão para o tratamento de 50 mL de BEV-FL. Depois de centrifugadas, as amostras foram filtradas em filtros de 0.45 µm para análise cromatográfica com objetivo de monitorar os compostos inibidores. Essas frações, antes e depois da destoxificação, tiveram pH medido em pHmetro da marca Methron modelo 827 pH Lab (São Paulo, Brasil). As amostras identificadas como destoxificadas (BEV-FLD) ou não (brutas) (BEV-FLB).

Para os testes escalonados, visando a fermentação no biorreator, adicionou-se 900 mL de amostra em um frasco Schott com capacidade de 1 L e tratadas com 18 g de carvão ativado. As amostras foram agitadas e deixadas em repouso por 10 min. Em seguida, as amostras foram filtradas utilizando filtros de fibra de vidro 0.45 µm (Sigma-Aldrich/Merck Millipore, Barueri, SP), em funil de Büchner, e reservadas. O processo foi realizado por três vezes conforme descrito anteriormente.

O carvão utilizado teve sua caracterização realizada por meio da técnica de adsorção/dessorção de nitrogênio de Brunauer-Emmet-Teller (BET), empregando um analisador QUANTACHROME, modelo NOVA 2000 (Boynton Beach, Estados Unidos), para a aquisição das isotermas de absorção. Amostras de carvão antes e depois do processo de destoxificação foram desgaseificados a vácuo por 3 h a 200 °C. Em seguida, a análise foi conduzida sob temperatura de nitrogênio líquido (-196 °C) avaliando-se 20 pontos de adsorção e 20 de dessorção. A área superficial específica das amostras foi calculada usando o método de pontos múltiplos de BET e o volume e tamanho médio dos poros conforme o modelo de Barrett-Joyner Halenda (BJH), ambos utilizando o software Quantachrome™ NovaWin (BRANAUER; EMMET; TELLER, 1938).

#### 4.2.4 Hidrólise Enzimática

Diferentes ensaios de hidrólise enzimática foram realizados para os materiais pré-tratados. As diferenças empregadas foram no teor de sólidos totais e enzimas, Cellic CTec3 e Cellic HTec3, enquanto os demais parâmetros da reação foram mantidos constantes, como a temperatura de 50 °C, agitação de 150 rpm e tampão acetato de sódio 50 mmol·L<sup>-1</sup> em pH 5,2. Alíquotas foram coletadas durante o processo, filtradas em filtro de 0,45 µm e conduzidas à análise cromatográfica. A liberação de açúcares (celobiose, glucose e xilose) durante o processo hidrolítico foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando as mesmas condições descritas no item 4.2.1. Os rendimentos de hidrólise foram calculados em relação à quantidade de carboidratos presentes nos materiais utilizados. Para glucanas, o rendimento foi expresso como equivalentes de glucose (EqGlc), que considera o somatório das concentrações de glucose e celobiose presentes no meio reacional ([EqGlc] = [glucose] + 1,0526 [celobiose]).

Para a determinação da atividade da celulase seguiu-se a metodologia descrita por Rabelo (2010). Partiu-se da solução de celulase, realizou-se uma diluição, de 1:20 e 4 novas diluições foram realizadas a partir desta. Em cada tubo de ensaio adicionou-se 50 mg de papel de filtro e em seguida 1,0 mL de tampão acetato de sódio 0,05 mol·L<sup>-1</sup> pH 4,8. Os tubos foram colocados em um banho termostático a 50 °C durante 10 min para equilíbrio de temperatura. Em seguida, sem retirar do banho, adicionou-se 0,5 mL da enzima diluída a cada tubo e estes reagiram por 60 minutos. Ao final deste período, interrompeu-se a reação em um banho de gelo fundente e após, adicionou-se 3 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Os tubos foram fervidos durante 5 minutos a 95 °C e posteriormente transferidos para um banho de gelo. Após o assentamento da polpa de papel restante da reação de hidrólise, a amostra foi lida em 540 nm usando espectrofotômetro VARIAN, modelo Cary 100 (Varian, EUA). Para o preparo do tubo do branco, adicionou-se 1,5 mL do tampão, o controle da enzima foi preparado adicionando-se 1,0 mL do tampão e 0,5 mL de cada uma das diluições da enzima, totalizando 4 tubos controle, que ao final do tempo reacional, tiveram suas reações paradas com a adição do DNS, e então reagidos como descrito anteriormente. O tubo controle do substrato foi preparado adicionando 1,5 mL do tampão citrato e 50 mg de filtro de papel enrolado, que ao final de 60 minutos, também foi analisado pelo método DNS. O cálculo da atividade em unidade de papel de filtro

(FPU) por mL da solução original da enzima (não diluída) está baseada na liberação de 2,0 mg de glucose a partir de 50 mg de papel filtro em 60 min (GHOSE, 1987).

#### 4.2.5 Ensaio Microbiológicos

##### 4.2.5.1 Ativação da cepa

A cepa bacteriana de *B. coagulans* foi recebida liofilizada, sendo então necessário reativá-las. A reativação foi feita de acordo com instruções do fabricante. Transferiu-se 1,0 g para um erlenmeyer de 50 mL contendo 25 mL de meio MRS (de Man Rogosa & Sharpe), previamente preparado e autoclavado (55 g de meio MRS Broth em 1000 mL de água destilada) (HIMEDIA, Curitiba, Brasil). Este foi incubado em estufa a 35 °C durante 48 h. Para a criação de um banco para manutenção da cepa, alíquotas de 1 mL do caldo foram colocados em criotubos de 2,5 mL com 30% de glicerol e armazenados em freezer a -20 °C. O repique foi realizado inoculando-se 5 mL em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio MRS, na temperatura de 50 °C, 150 rpm, por 48 h. A partir de uma alíquota de 0,1 mL de cada meio, foi realizada uma diluição seriada em tubos contendo água peptonada (1% m·v<sup>-1</sup>).

A metodologia empregada na contagem de células viáveis, foi a técnica do *pour-plate* descrita pela *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 1978). Para a contagem de Unidade Formadora de Colônia, UFC, foi utilizado o meio MRS-ágar (HIMEDIA, Curitiba, Brasil). De acordo com orientação do fabricante, 67 g do meio foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada, sendo esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 min. O meio líquido resultante foi disposto em placas de Petri de 20 ml, solidificados em ambiente estéril.

Os meios foram deixados abertos, dentro da cabine de fluxo laminar, para solidificação e em seguida, foram colocados, com auxílio de alça de Drigalsky, 100 µL das diluições nas placas. As placas foram incubadas por 24 h a 50 °C e as colônias foram contadas. O experimento foi conduzido em triplicata. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por µL de amostra (UFC·µL<sup>-1</sup>). Como controle, as colônias foram verificadas para confirmar a identidade da cepa por meio da coloração de Gram e de testes de atividade catalásica.

#### 4.2.5.2 Coloração de Gram

Adicionou-se uma gota de água estéril no centro de uma lâmina limpa e desengordurada e em seguida uma alçada de uma colônia bacteriana foi emulsionada nela, após isso a lâmina secou ao ar e o material foi fixado na lâmina através da chama de um bico de Bunsen. Após isso, essa lâmina foi analisada com o uso de um kit de coloração de Gram da Laborclin (Pinhais, Brasil). O método consistiu no tratamento da amostra fixada com um corante primário, o cristal violeta, seguido da adição de lugol. Posteriormente, a lâmina foi descorada com acetona e tratada com um corante secundário, a fucsina básica. A lâmina corada foi observada e fotografada em microscópio óptico (Leica, modelo DM2700, Wetzlar, Alemanha) utilizando a objetiva de imersão (100x de aumento total). Foram observadas as características morfológicas, presença de esporos e coloração de Gram.

#### 4.2.5.3 Atividade catalásica

Uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (v·v<sup>-1</sup>) (Vetec, Curitiba, Brasil) foi adicionada sobre as colônias fixadas em placa de Petri para a detecção da enzima catalase, presente em bactérias que possuem citocromos. A enzima catalase converte peróxido de hidrogênio em oxigênio e água e a liberação deste é observada pela formação de bolhas. (KONEMAN; ALLEN; JANDA, 2008).

#### 4.2.5.4 Preparo do Inóculo

O meio MRS foi preparado nas mesmas condições de ativação da cepa (item 4.2.5.1), e então adicionado em erlenmeyers de 150 mL, os quais foram esterilizados em autoclave a 120 °C durante 15 min. O conteúdo de 1 tubo do banco de cepas foi descongelado a temperatura ambiente (24 °C) e adicionado em cada erlenmeyer, incubados por 24 h em agitadora orbital a 35 °C, 100 rpm. A seguir as amostras foram centrifugadas e o precipitado contendo as células foi lavado com água ultrapura esterilizada. Preparou-se uma suspensão que tivesse densidade ótica (D.O) igual a 1, medida em espectrofotômetro a 600 nm, tendo sido também comparada ao ponto 2 na escala McFarland, Biomérieux® (Marcy-l'Étoile, França) (6,0 x 10<sup>8</sup> UFC·mL<sup>-1</sup>).

#### 4.2.6 Fermentação dos hidrolisados

Amostras dos hidrolisados enzimáticos e, também, a fração hidrossolúvel do pré-tratamento foram fermentadas. Os ensaios de fermentação foram conduzidos em

duplicatas utilizando o biorreator Infors HT, modelo Multifors 2, com capacidade de 0,5 L (Bottmingen-Basel, Suíça). Transferiu-se o volume de 300 mL de amostra para cada cuba do biorreator, que foi acrescido de 1% ( $m \cdot v^{-1}$ ) de extrato de levedura e 10% ( $v \cdot v^{-1}$ ) de inóculo (30 mL). A temperatura foi de 50 °C e a agitação de 150 rpm. O pH foi mantido em 6,0 com o uso de uma solução de NaOH 5 mol·L<sup>-1</sup> e o processo de fermentação se deu por 24 h. O sistema operacional do equipamento manteve a atmosfera em anaerobiose por meio da injeção de gás nitrogênio no meio. Alíquotas foram retiradas sempre em duplicata, centrifugadas e analisadas por HPLC para quantificação de carboidratos, ácido láctico, ácido acético, furfural e HMF.

#### 4.2.6.1 Massa e Concentração Celular

A massa seca foi determinada pela filtração de 2 mL de amostra coletada no final das fermentações. O processo de filtração ocorreu em membrana de acetato de celulose (25 mm de diâmetro com poro de 0,22 µm), previamente seca em estufa de secagem a 90°C até massa constante ( $m_1$ ). Em seguida, a membrana contendo a amostra filtrada foi seca novamente em estufa de secagem nas condições citadas, ( $m_2$ ). A massa celular ( $m$ ) foi obtida pela diferença entre  $m_2$  e  $m_1$ . A Equação 3 foi utilizada para determinação da concentração celular  $[Cx]$ ,

$$[Cx] = \frac{m}{V} \quad (3)$$

em que X é a concentração celular ( $g \cdot L^{-1}$ ), M é a massa seca (g) e V é o volume de amostra filtrada (L). Em seguida as amostras foram dissolvidas em 1 mL de água destilada e finalmente às suspensões resultantes foram comparadas à escala McFarland (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, França) afim de se obter a concentração celular equivalente à UFC·mL. Realizou-se a construção de uma curva de correlação a partir da OD de diferentes concentrações de biomassa celular em diferentes diluições, a qual gerou uma equação linear do tipo  $y = ax + b$ . Esta equação foi utilizada para estimar os valores de concentração celular ( $g \cdot L^{-1}$ ) ao longo do tempo de cultivo a partir da leitura da densidade óptica realizada em cada amostragem

#### 4.2.6.2 Determinação da velocidade específica máxima do crescimento celular

A velocidade específica de crescimento celular ( $\mu$ ), calculada a partir do aumento de biomassa por unidade de tempo ( $h^{-1}$ ), é definida por meio de um balanço de massa em reator em batelada representado pela Equação 4 (CUBAS-CANO *et al.*, 2020; OLSZEWSKA-WIDDRAT *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020), levando-se em conta a concentração celular ( $Cx$ ).

$$\frac{dCx}{dt} = \mu \cdot Cx \quad (4)$$

Na fase exponencial de crescimento celular, quando  $\mu$  é igual à  $\mu_{max}$ , o valor da velocidade específica máxima de crescimento é determinado integrando-se e rearranjando-se a Equação 4 para se obter a Equação 5 (OLSZEWSKA-WIDDRAT *et al.*, 2020), onde  $x$  representa concentração celular de micro-organismo no tempo onde foi retirada a alíquota, e  $t$  é o tempo de cultivo. Essa equação é linear e o valor de  $\mu_{max}$  pode ser obtido através do método dos mínimos quadrados.

$$\mu_{max} = \ln\left(\frac{x_2 - x_1}{t_2 - t_1}\right) \quad (5)$$

#### 4.2.6.3 Determinação do fator de conversão de substrato em células

Para o cálculo do rendimento de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) utilizou-se a Equação 6 (HISS, 2001), levando-se em conta a quantidade de células no início ( $X_0$ ) e as formadas ao final da fermentação ( $X$ ) e a massa de substrato inicial ( $S_0$ ) e a consumida ( $S$ ).

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (6)$$

#### 4.2.6.4 Fator de conversão de substrato em ácido láctico

O fator de conversão de substrato ( $Y_{p/s}$ ) ( $g \cdot g^{-1}$ ) foi obtido a partir do ácido láctico inicial ( $P_0$ ) e o formado ( $P$ ) durante a fermentação em relação ao substrato inicial ( $S_0$ ) e o consumido ( $S$ ), conforme Equação 7 (HISS, 2001):

$$Y_{p/s} = \frac{(P - P_0)}{S_0 - S} \quad (7)$$

#### 4.2.6.5 Produtividade

A produtividade  $P$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ) foi determinada pela razão entre a quantidade de ácido láctico formado e o tempo total de fermentação ( $T$ ), conforme a Equação 8 (HISS, 2001; OLSZEWSKA-WIDDRAT et al., 2020; ZHANG *et al.*, 2020):

$$P = \frac{P - P_0}{T} \quad (8)$$

#### 4.2.7 Análise estatística

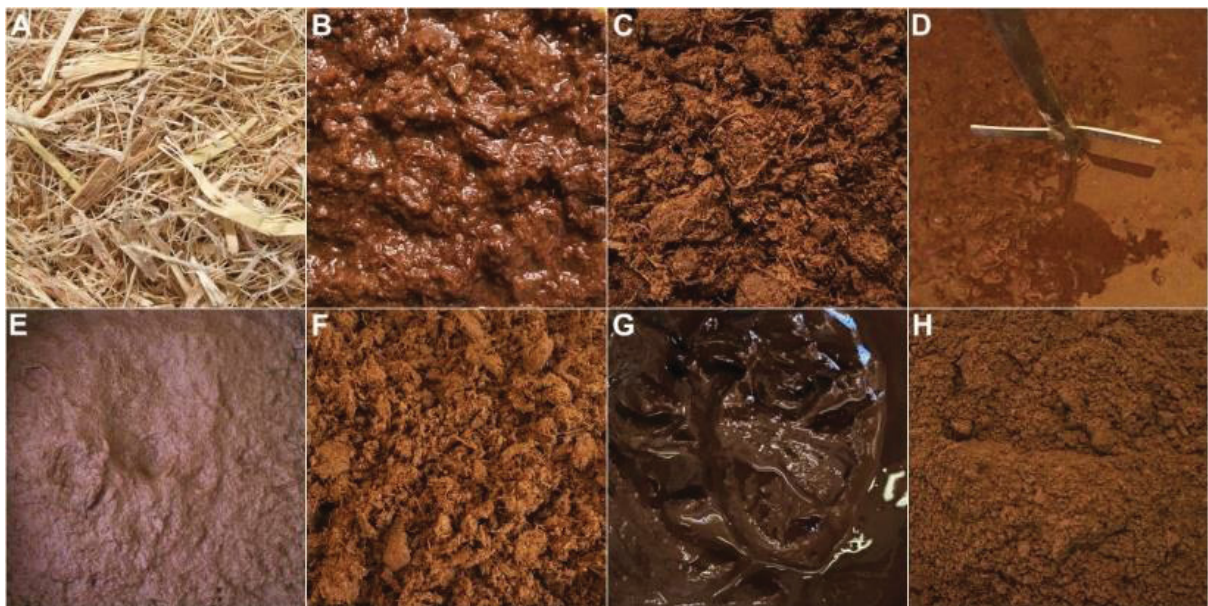
Os resultados dos experimentos foram avaliados a partir do software R Studio e GraphPd. Calcularam-se os principais efeitos das variáveis estudadas, verificando suas interações, superfície de resposta, a validação do modelo ao nível de 10% de significância, análise de variância (ANOVA) e testes  $F$  e  $t$  de Student para as médias.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A explosão a vapor proporciona alterações na estrutura da biomassa, sendo então vital entender os efeitos causados por diferentes condições reacionais sobre as propriedades químicas e físicas desse material e a complexidade da fração hidrossolúvel gerada durante o pré-tratamento. Nesse sentido, observou-se os resultados das duas diferentes condições de explosão a vapor da biomassa e os impactos causados nos processos de hidrólise enzimática e fermentação. O pré-tratamento foi realizado em escala piloto (reator de 10 L), o que permitiu utilizar o bagaço de cana sem prévia etapa de moagem, sendo assim, os experimentos refletiram condições que podem ser escalonadas para a produção industrial. A FIGURA 8 ilustra o processo ao qual o bagaço de cana-de-açúcar foi submetido, desde o aspecto do material recebido passando pelos resultados da explosão a vapor até o resíduo da hidrólise enzimática.

Figura 8. Fotos do material sob as várias etapas de processamento



FONTE: O autor, 2021.

LEGENDA: Material recebido (a), explodido a vapor a 195 °C por 7,5 min (b), centrifugado após o pré-tratamento (c), lavado com água a 5% de sólidos (d), filtrado (e), centrifugado novamente (f) e, por fim, hidrolisado com Cellic CTec3 por 96 h (g), seco em estufa a 37 °C e macerado (h).

## 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

As determinações da quantidade de cinzas e extraíveis foram realizadas diretamente sobre amostras do bagaço. Já o perfil de carboidratos e lignina foram determinados a partir de amostras de bagaço livre de extraíveis.

Isso se dá em vista do fato que, durante a determinação dos carboidratos por hidrólise ácida, os materiais extraíveis podem reagir com o ácido sulfúrico, gerando espécies insolúveis em água que acabam quantificadas como lignina insolúvel em ácido (SLUITER *et al.*, 2008d). Essa análise permitiu a determinação tanto da lignina insolúvel como da solúvel em meio ácido, sendo que a soma dessas frações representa o teor de lignina total. A análise cromatográfica dos hidrolisados em ácido sulfúrico revelou a presença dos principais constituintes de polissacarídeos presentes na biomassa, como glucose (celulose), xilose e arabinose (hemiceluloses), além do ácido acético presente nas hemiceluloses como grupamentos acetila. Também foi possível quantificar a presença de HMF e furfural nesses hidrolisados ácidos. O HMF é resultante da desidratação de hexoses como a glucose, já o furfural de pentoses como a arabinose e a xilose.

A TABELA 1 apresenta os resultados de composição química, expressos em relação à massa seca do material recebido. Em alguns casos, fatores de conversão foram utilizados porque a massa molar dos produtos de hidrólise difere da dos componentes que os originaram. Isso incluiu a quantificação de HMF e furfural, cujos teores devem ser considerados para o cálculo dos valores totais de glucanas (celulose) e hemiceluloses, respectivamente. O bagaço de cana selecionado para esse estudo apresentou teores de 37,8% de anidrogucose, 21,0% de anidroxilose e 22,8% de lignina total. Tais dados podem ser considerados compatíveis com valores relatados na literatura por outros autores. Neves, Pitarelo e Ramos (2016) encontraram teores de 34% de anidrogucose, 18% de anidroxilose e 21,9% de lignina no bagaço utilizado em seus estudos. Já em relação aos teores de extraíveis em água e etanol, distintos valores podem ser parcialmente explicados pela diferença de polaridade dos sistemas empregados nos diversos estudos de caracterização do bagaço de cana.

Silveira *et al.* (2018) encontraram teores similares no bagaço de cana utilizado em seus estudos de explosão a vapor. O material apresentou 40% de anidrogucose, 21,5% de anidroxilose, 2,3% de anidroarabinose, 23,6% de lignina total e 3,5% de cinzas. Já Silva *et al.* (2018) estudaram a explosão a vapor do bagaço de cana

utilizando um material composto majoritariamente por 42% de anidroglicose, 27,6% de anidroxilose, 24,2% de lignina total 2,1% de cinzas.

Tabela 1. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos de explosão

<b>Componente</b>	<b>Percentual (%)</b>
Anidroglicose <sup>1</sup>	37,8 ± 0,7
Anidroxilose <sup>2</sup>	21,0 ± 0,8
Anidroarabinose <sup>2</sup>	1,3 ± 0,3
Grupos acetila <sup>2</sup>	2,6 ± 0,1
Anidrohexoses identificadas como HMF	1,1 ± 0,2
Anidropentoses identificadas como furfural	0,6 ± 0,1
Lignina total <sup>3</sup>	22,8 ± 0,7
Lignina solúvel em ácido	5,0 ± 0,1
Lignina insolúvel em ácido (sem cinzas)	19,1 ± 0,6
Cinzas da lignina insolúvel em ácido	6,8 ± 0,4
Extraíveis totais	6,5 ± 0,1
Extraíveis em água	2,3 ± 0,2
Extraíveis em etanol	4,8 ± 0,2
Cinzas	4,0 ± 0,1
<b>Total</b>	<b>98,2</b>

<sup>1</sup> Presente como componente das  $\beta$ -(1→4)-D-glucanas (celulose)

<sup>2</sup> Presente como componente das heteroxilanas (hemiceluloses)

<sup>3</sup> Somatório das ligninas solúvel e insolúvel (livre de cinzas) em ácido sulfúrico diluído

FONTE: O autor, 2021.

Uma série de fatores podem explicar as variações comumente observadas nos valores de literatura para a composição química do bagaço de cana-de-açúcar. Dentre esses podem ser citados as condições edafoclimáticas da região onde o cultivo foi realizado, a sazonalidade do processo de colheita, a ampla variedade de cultivares de cana-de-açúcar existente no mercado, o estado de maturação da cana no momento da colheita e a tecnologia utilizada para a colheita, que pode ser manual ou mecanizada (ANDRADE *et al.*, 2017).

## 5.2 EXPLOSÃO A VAPOR

Após caracterizado, o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado pelo processo de explosão a vapor, nas condições de 195 °C de temperatura e tempos de 7,5 e 15 min, em duplicatas. Foi calculado então o balanço de massas dos experimentos com

base nas frações BEV-FS e BEV-FL. Esses dados são exibidos na TABELA 2 em termos de média e desvio-padrão.

Tabela 2. Balanço de massas das explosões a vapor do bagaço de cana-de-açúcar, realizadas a 195 °C

Parâmetro	Tempo de permanência no reator	
	7.5 min	15 min
Massa seca inicial (g)	722,6	721,8
Massa seca pós-explosão (g)	447,8 ± 9,3	454,4 ± 20,1
Recuperação mássica (%)	61,9 ± 1,5	59,3 ± 1,1
Volume de fração líquida (L)	1,5 ± 0,1	2,2 ± 0,1
pH da fração líquida	3,2 ± 0,1	3,0 ± 0,2
Sólido na fração líquida (g·L <sup>-1</sup> )	5,3 ± 0,2	3,7 ± 0,3
Cinzas na fração líquida (g·L <sup>-1</sup> )	1,1 ± 0,3	1,8 ± 0,2

FONTE: O autor, 2021.

A recuperação mássica do material foi em torno de 60% (base seca) em relação ao material acondicionado no reator. A perda encontrada pode ser atribuída à volatilização de compostos de baixa massa molar presentes no material *in natura*, tais como terpenos, álcoois alifáticos, aldeídos e derivados de ácido cinâmico, sobretudo produtos de degradação originados durante o processo de explosão a vapor, como HMF, furfural e ácido acético (RAMOS, 2003). Os valores encontrados foram similares aos trabalhos anteriormente realizados pelo grupo no mesmo reator de explosão a vapor. Neves, Pitarelo e Ramos (2016), ao tratarem bagaço de cana por explosão a vapor a 195 °C por 7,5 min em condição de auto-hidrólise, obtiveram uma recuperação de 11% na fração líquida e 62,8% na fração sólida, totalizando 73,8% de recuperação da matéria-prima admitida no vaso de reação.

Recuperações similares também foram encontradas em trabalhos de outros grupos de pesquisa. Batalha *et al.* (2015) realizaram explosão a vapor do bagaço de cana a 190 °C por 10 min e obtiveram uma recuperação mássica de 61,4% do material empregado em seu estudo.

Durante o processo de explosão de vapor, a biomassa foi aquecida com vapor saturado a alta pressão e esse procedimento provocou a expansão do vapor dentro da matriz lignocelulósica, separando as fibras individuais e rompendo a estrutura da parede celular. Observou-se que ao final da explosão dois tipos de materiais foram

obtidos de acordo com a severidade empregada no pré-tratamento. A FIGURA 9 apresenta o aspecto visual das amostras tratadas em diferentes condições e, portanto, com diferentes graus de severidade, representados por  $\log R_o$ , que corresponderam a  $\log R_o = 3,67$  para 7,5 min e  $\log R_o = 3,97$  para 15 min de tempo de reação. Outros processos de explosão a vapor já reportados na literatura resultaram em fatores de severidade na faixa de 2,8 a 4,5 (PEDERSEN; MEYER, 2010), o que é esperado visto que são empregadas diferentes temperaturas e tempos de residência no reator (CHORNET; OVEREND, 1991). Já a seleção das condições ideais para um determinado processo dependem intrinsecamente dos objetivos a serem atingidos com o fracionamento da biomassa lignocelulósica.

Figura 9. Aspecto das amostras explodidas a vapor a 195 °C por 7.5 (A e B) e 15 min (C e D)



FONTE: O autor, 2021.

LEGENDA: Amostras após explosão a vapor (A e C) e após separação da fração líquida (BEV-FL) por centrifugação (B e D).

As frações sólida e líquida da explosão a vapor foram caracterizadas quanto a sua composição e os dados encontram-se exibidos na TABELA 3 em termos de média e desvio-padrão. Após o pré-tratamento, as amostras de material pré-tratado apresentaram diminuição nos teores de anidroxilose inicialmente presentes no bagaço, enquanto a anidroarabinose não foi detectada em nenhuma das duas amostras independentemente do fator de severidade empregado. Em geral, pré-tratamentos mais longos fazem com que os carboidratos liberados sejam expostos a altas temperaturas por mais tempo, levando a maiores índices de degradação. Todavia, quando o pré-tratamento empregado é excessivamente brando, as hemiceluloses são recuperadas em maior rendimento, mas o substrato celulósico apresenta baixa acessibilidade à hidrólise enzimática (CARDONA *et al.*, 2010), visto que as condições empregadas não são capazes de alterar significativamente a organização estrutural da parede celular (JACQUET *et al.*, 2015).

Mais de 90% das hemiceluloses (anidroxilose e anidroarabinose) presentes no bagaço de cana foram hidrolisadas durante os pré-tratamento, o que ocasionou um aumento nos percentuais de anidroglicose e de lignina nos materiais pré-tratados. As hemiceluloses são bem mais suscetíveis à auto-hidrólise porque têm são estruturas amorfas, ramificadas e de baixo grau de polimerização na cadeia principal. Os componentes das hemiceluloses mais afetados foram a anidroarabinose e os grupamentos acetila, que estão presentes como substituintes da cadeia principal de xilanas e, portanto, apresentam maior acessibilidade química.

Tabela 3. Composição química e recuperação de BEV-FSL

Componente	Tempo de permanência no reator			
	7,5 min		15 min	
	Teor (%) <sup>1</sup>	R <sub>M</sub> (%) <sup>2</sup>	Teor (%)	R <sub>M</sub> (%)
Anidroglicose	54,7 ± 2,4	89,7 ± 1,8	55,5 ± 0,7	82,5 ± 1,1
Anidroxilose	3,0 ± 0,4	5,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	3,8 ± 0,1
Lignina Total <sup>3</sup>	30,5 ± 0,8	92,2 ± 1,9	31,2 ± 0,2	96,6 ± 0,3
Lignina Solúvel em ácido	5,7 ± 0,2	70,4 ± 1,5	5,9 ± 0,2	78,5 ± 0,2
Lignina Insolúvel em ácido <sup>4</sup>	27,8 ± 0,8	96,3 ± 0,9	28,9 ± 0,1	101,4 ± 0,3
Cinzas da Lignina <sup>5</sup>	10,4 ± 0,5	152,4 ± 0,3	12,3 ± 0,5	180,9 ± 0,3
Cinzas	6,1 ± 1,5	93,7 ± 1,9	6,8 ± 1,1	113,8 ± 0,3
<b>TOTAL</b>	<b>94,3</b>		<b>94,7</b>	

<sup>1</sup>Expresso em % (m·m<sup>-1</sup>)

<sup>2</sup>Recuperação mássica expressa em % em relação ao material antes do pré-tratamento

<sup>3</sup>Excluindo as cinzas de lignina insolúvel em ácido

<sup>4</sup>Incluindo as cinzas da lignina insolúvel em ácido

<sup>5</sup>Determinada na lignina insolúvel em ácido

FONTE: O autor, 2021.

As diferenças entre os valores encontrados após o pré-tratamento foram significativas apenas para xilose ( $p < 0,05$ ), o que era esperado em vista de que o aumento na severidade proporciona maior remoção das hemiceluloses do bagaço. Outros autores na literatura encontraram valores próximos a estes ao realizarem a explosão a vapor desse mesmo material. Ewanick e Bura (2011) estudaram esse pré-tratamento empregando a temperatura de 205 °C por 10 min e encontraram teores de 51% de anidroglicose, 3,6% de hemiceluloses e 34% de lignina no material resultante da explosão a vapor.

Neves, Pitarelo e Ramos (2016) ao tratarem bagaço de cana por explosão a vapor, a 195 °C por 7.5 min, obtiveram recuperações de 54,9 e 3,4% nos teores de anidroglicose e anidroxilose respectivamente.

Pal *et al.* (2017b) realizaram a explosão a vapor do bagaço de cana a 160 °C e a 180 °C ambos durante 20 min. Esses autores encontraram 42.8% de anidroglicose, 20.8% de anidroxilose e 21,5% de lignina insolúvel em ácido nos substratos pré-tratados a 160 °C. Já a 180 °C, os teores encontrados foram de 46.8%, 9.3% e 30,8% respectivamente.

Espírito Santo *et al.* (2019) avaliaram quatro processos de explosão a vapor em condição de auto-hidrólise, nos tempos de 8, 10 e 15 min. O teor máximo de anidroglicose para as condições de auto-hidrólise testadas foram 54%, já os teores de anidroxilose se mostraram maiores, em torno de 6%.

Após o processo de centrifugação e caracterização, os dois substratos obtidos foram divididos. Uma quantidade conhecida de cada amostra passou por um processo de lavagem com água numa proporção 5% ( $m \cdot v^{-1}$ ). A TABELA 4 apresenta os dados do balanço de massa realizado após o processo.

Tabela 4. Rendimento mássico da fração BEV-FSL

Componente	Tempo de permanência no reator	
	7,5 min	15 min
Massa seca (g)	212,4 ± 8,7	236,7 ± 8,1
Massa seca pós-lavagem (g)	192,1 ± 1,5	223,8 ± 2,4
Recuperação (%)	90,4 ± 1,3	94,5 ± 1,5
Quantidade de água utilizada (L)	4,3 ± 0,2	4,7 ± 0,2
Perda na água de lavagem ( $m \cdot v^{-1}$ )	4,2 ± 0,2	2,7 ± 0,2
Perda na filtração (g)	2,5 ± 0,3	2,5 ± 0,3

FONTE: O autor, 2021.

A perda mássica durante o processo de lavagem foi atribuída à solubilização de hemiceluloses oriundas da fração C5 contida nas fibras do material pré-tratado. Porém, parte dessa perda pode ter ocorrido pela retenção de material particulado nos elementos de filtração.

BEV-FL também teve sua composição química avaliada e a quantificação dos carboidratos, ácido acético, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural por HPLC é apresentada na TABELA 5. A pós-hidrólise dessa fração do pré-tratamento revelou

concentrações de xilose em torno de  $11,2 \pm 0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para log 7,5 min e  $4,3 \pm 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para 15 min.

Arruda (2011), avaliando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana, obtido a partir da explosão a vapor realizada a  $150 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min, encontrou teores de  $15,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de anidroxilose,  $1,82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de anidroglicose,  $1,45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de anidroarabinose,  $5,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido acético,  $0,63 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de furfural e  $0,31 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de HMF. E ao medir o pH da fração líquida, encontraram um valor de 1,52. Os valores do presente estudo aproximam-se destes, exceto pela maior quantidade de ácido acético e furfural, sendo de  $9,7 \pm 0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $0,8 \pm 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para 7,5 min, e de  $12,1 \pm 0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $1,4 \pm 0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para 15 min, respectivamente.

Tabela 5. Composição química ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) da fração BEV-FL

Componente	Tempo de permanência no reator	
	7,5 min	15 min
Glucose	$2,2 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$
Xilose	$11,2 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,1$
Arabinose	$0,6 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$
Ácido Acético	$9,7 \pm 0,3$	$12,1 \pm 0,5$
Furfural <sup>1</sup>	$0,8 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,3$
HMF <sup>2</sup>	$1,6 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,1$

<sup>1</sup>Resultante da degradação de pentoses

<sup>2</sup>Resultante da degradação de hexoses

FONTE: O autor, 2021.

A presença de ácido acético foi constatada nos hidrolisados de ambas as condições de pré-tratamento. Quantidades maiores nos hidrolisados da explosão de maior severidade ( $p < 0,05$ ) podem ser explicadas por uma hidrólise das hemiceluloses mais eficiente. Já a presença desse ácido tem como origem a hidrólise dos grupamentos acetila presentes nas hemiceluloses do material de origem (MARTÍN *et al.*, 2007).

Du *et al.* (2010) identificaram e quantificaram um total de 40 possíveis substâncias tóxicas geradas pela decomposição da biomassa lignocelulósica. Assim, o controle da inibição dos micro-organismos responsáveis pela fermentação é um fator essencial para maximizar a conversão da biomassa lignocelulósica em produtos de interesse (KLINKE *et al.*, 2004) e o entendimento da tolerância desses micro-organismos aos inibidores, presentes nos hidrolisados, é determinante para que o



processo fermentativo seja eficiente. Assim, o presente trabalho também incluiu ensaios de destoxificação das frações hidrossolúveis do pré-tratamento.

### 5.3 ENSAIOS DE DESTOXIFICAÇÃO POR ADSORÇÃO EM CARVÃO ATIVADO

O carvão adquirido foi caracterizado em relação à sua porosidade, área superficial, volume e tamanho dos poros, umidade e cinzas. Esses dados são expressos na TABELA 6. A porosidade é a propriedade principal responsável pela textura e propriedades mecânicas do carvão (GIRALDO; MORENO-PIRAJÁN, 2014).

Tabela 6. Resultado do ensaio de caracterização do carvão ativado utilizado nos experimentos

Parâmetro	Valor encontrado
Cinzas	4,36%
Umidade	21%
Área Superficial	507.971 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup>
Volume médio dos poros	0,33 cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup>
Tamanho médio dos poros	1,29 nm

FONTE: O autor, 2021.

A capacidade do carvão ativado na destoxificação dos hidrolisados oriundos do pré-tratamento foi então investigada a partir da comparação entre as amostras. A TABELA 7 mostra a composição em carboidratos, furfural, HMF e ácido acético da fração BEV-FL obtidos após o pré-tratamento, bem como após o processo de destoxificação (BEV-FLD).

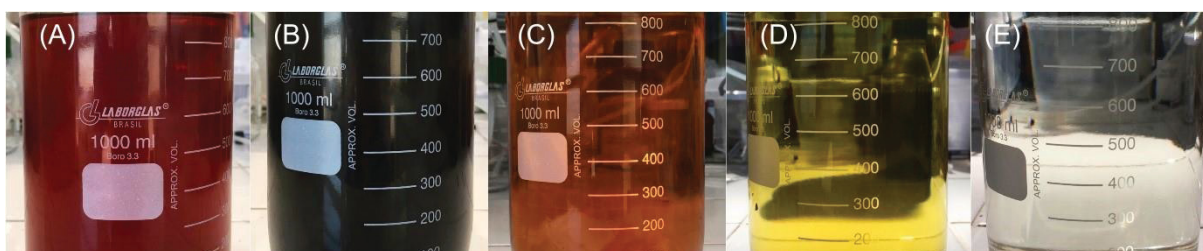
Tabela 7. Teores encontrados nas frações BEV-FLB (bruta) e BEV-FLD (destoxificada) (g·L<sup>-1</sup>)

Componente	Tempo de permanência no reator			
	7,5 min		15 min	
	BEV-FLB	BEV-FLD	BEV-FLB	BEV-FLD
Glucose	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Xilose	11,2 ± 0,2	11,1 ± 0,2	4,3 ± 0,1	4,3 ± 0,2
Arabinose	0,62 ± 0,02	0,60 ± 0,04	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Furfural	1,62 ± 0,02	0,04 ± 0,02	1,6 ± 0,1	0,03 ± 0,01
HMF	0,79 ± 0,01	0,02 ± 0,02	1,4 ± 0,3	0,03 ± 0,01
Ácido acético	9,7 ± 0,3	4,4 ± 0,5	12,1 ± 0,5	5,2 ± 0,2

FONTE: O autor, 2021.

A análise cromatográfica dos hidrolisados antes e depois da destoxificação mostrou que foi possível a remoção dos principais inibidores do processo fermentativo, HMF e furfural. O tratamento com carvão ativado levou a uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da concentração de furfural, da ordem de 97,5% para a fração BEV-FL do pré-tratamento de 7,5 min e de 98,1% no hidrolisado oriundo da condição de maior severidade. No caso do HMF, o processo de destoxificação removeu 97,4% e 97,9% de sua massa dessas mesmas frações, respectivamente. Para o ácido acético, as remoções do pré-tratamento por 7,5 e 15 min foram de 55,2 e 57,2%, respectivamente. Portanto, o processo de destoxificação por adsorção em carvão ativado se mostrou eficiente. A FIGURA 10 apresenta o aspecto visual de BEV-FL, seu escurecimento após da adição do carvão, e a mudança da coloração de acordo com o número de vezes que a amostra teve contato com o carvão, sendo que na terceira vez esta apresenta aspecto incolor e límpido.

Figura 10. Processo de destoxificação da fração BEV-FL (7,5 min)



LEGENDA: BEV-FL (A) e após adição do carvão (B), aspecto após 1x (C), 2x (D) e 3x (E) (BEV-FLD)

FONTE: O autor, 2021.

Mussatto (2002), avaliando a destoxificação da fração de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, concluiu que a maior remoção de compostos fenólicos por adsorção em carvão ativado se deu em pH 2. Essa variável foi considerada fundamental em seu estudo e o seu efeito foi atribuído ao fato de que, em baixos valores de pH, os fenóis presentes no meio não estão ionizados e por isso podem ser facilmente adsorvidos em carvão ativado.

Marton (2002) testou a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana utilizando 1% de carvão ativado a 60 °C por 30 min, sob agitação de 200 rpm. Essas condições proporcionaram a remoção de 44,18% de ácido acético, 58,27% do furfural e 59,69% de HMF.

Lu, Dong e Yang (2013) relataram que o uso de 2% ( $m \cdot v^{-1}$ ) de carvão ativado comercial, aquecimento a 90 °C e agitação de 150 rpm por 30 min promoveu a remoção de 80% de furfural e 87,9 % de HMF de hidrolisados ácidos de lascas de madeira. Posteriormente, o carvão ativado foi removido por filtração a vácuo.

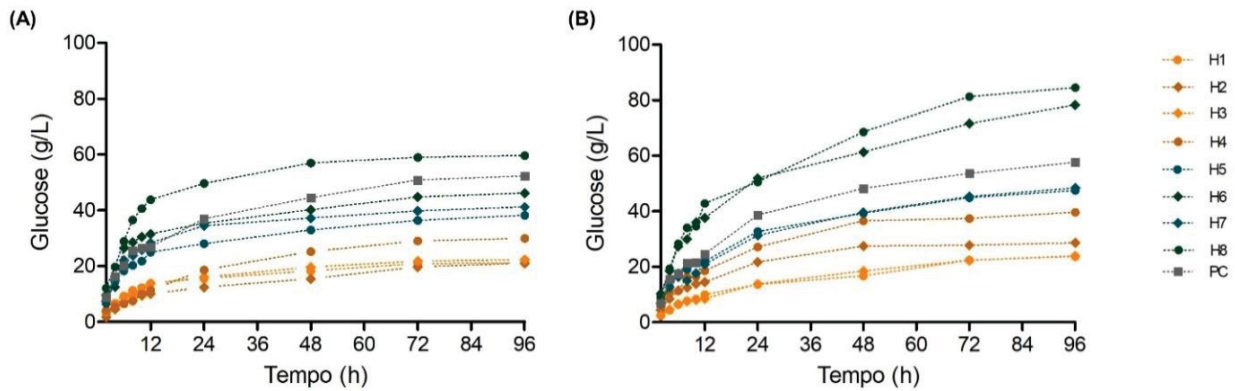
López-Linares *et al.* (2015) avaliaram a destoxificação de compostos inibidores em hidrolisados ácidos de canola e concluíram que a técnica de destoxificação com carvão ativado é mais eficiente que a baseada em resina de troca iônica. Os hidrolisados foram passados em uma coluna de cobre revestida com carvão ativado com partículas de 3 mm de diâmetro. As amostras foram passadas duas vezes em cada coluna e a cada passagem os recheios eram substituídos. A coluna com carvão ativado proporcionou a remoção de 93% de furfural, 75% de HMF e 45% de ácido acético, enquanto valores inferiores de 68%, 25% e 22% foram obtidos com a resina, respectivamente.

Miura, Suzuli e Aoyama (2016) estudaram a técnica de adsorção com 10% ( $m \cdot v^{-1}$ ) de carvão ativado a 30 °C por 1 h para a destoxificação de hidrolisados ácidos de madeira. Foi constatada a remoção de aproximadamente 83% de furfural e outros compostos fenólicos de baixa massa molar, enquanto permaneceram praticamente inalteradas as concentrações de carboidratos e ácido acético. Quando comparada com outros processos de destoxificação, a adsorção em carvão ativado tem baixo custo e seu uso demanda baixo consumo de energia.

#### 5.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A FIGURA 11 apresenta os resultados da hidrólise enzimática dos substratos BEV-FSL. Todas as curvas indicam que houve uma diminuição gradativa da velocidade de hidrólise ao longo do tempo, sendo este efeito mais pronunciado para o material pré-tratado por 7,5 min. Os experimentos H1 a H4 continham 20 mg/g<sub>ST</sub> de Cellic CTec3, enquanto os experimentos H3 e H4 continham uma quantidade adicional de 2 mg/g<sub>ST</sub> de Cellic HTec3. Por outro lado, os experimentos H5 a H8 continham 60 mg/g<sub>ST</sub> de Cellic CTec3 e a Cellic HTec3 estava presente apenas nos experimentos H7 e H8. Finalmente, o ponto central do planejamento continha 40 mg/g<sub>ST</sub> de Cellic CTec3 e 4 mg/g<sub>ST</sub> de HTec3. As amostras dos experimentos H1 a H5 foram estatisticamente semelhantes ( $p > 0,05$ ) e não apresentaram bons rendimentos de hidrólise. Sendo assim, estas condições foram descartadas para as etapas seguintes desse projeto.

Figura 11. Curvas de hidrólise enzimática dos substratos BEV-FSL nos experimentos do planejamento



LEGENDA: 7,5 min (A) e 15 min (B)

FONTE: O autor, 2021.

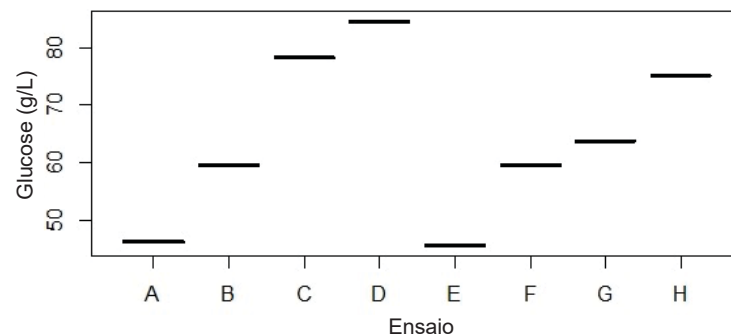
Muitos fatores podem explicar a queda na velocidade de reação ao longo do tempo e estes podem ser divididos em dois grupos: os associados à estrutura do substrato e os relativos ao desempenho das enzimas durante o processo hidrolítico (SUN; CHENG, 2002). A respeito do primeiro grupo, figuram alterações na porosidade, na área superficial de contato, na composição química e na distribuição de hemiceluloses e lignina no substrato, além de mudanças no índice de cristalinidade e no grau de polimerização da celulose, todas associadas ao tipo de pré-tratamento empregado. Assim, polissacarídeos mais acessíveis como as hemiceluloses e a celulose amorfa foram rapidamente hidrolisados no início da reação, enquanto outras regiões menos acessíveis levaram mais tempo para serem hidrolisadas (SATTLER *et al.*, 1989; VÄLJAMÄE *et al.*, 2003).

A influência da presença de hemicelulases (Cellic HTec3) pode ser observada nos experimentos H6 e H8, realizados com o mesmo teor de sólidos ( $20\% \text{ m}\cdot\text{v}^{-1}$ ) e mesma quantidade de Cellic CTec3. A presença de Cellic HTec3, ausente em H6 e presente em H8 ( $6 \text{ mg g}^{-1}$  de substrato), resultou em maiores concentrações de glucose liberada no meio. Por exemplo, ao se comparar os perfis de hidrólise dos substratos lavados, observa-se que concentrações de glucose diferiram significativamente entre si ( $p < 0,05$ ), sendo de  $59,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (7,5 min) e  $84,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (15 min) nos experimentos realizados com a adição de Cellic HTec3 e de  $46,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (7,5 min) e  $78,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (15 min) nos experimentos realizados na ausência de Cellic HTec3.

O emprego de teores de sólidos totais na faixa entre 20 e 40% promove a formação de suspensões muito densas em que há pouca água livre, prevalecendo assim as interações interfibrilares (COUSSOT, 2005). A água existente no sistema fica absorvida na biomassa quando o teor de sólidos totais se aproxima de 20% e isso provoca um aumento da viscosidade e dificulta a agitação e/ou homogeneização do meio (HODGE *et al.*, 2009; MODENBACH; NOKES, 2013). Como consequência, a eficiência da hidrólise enzimática diminui consideravelmente (VIAMAJALA *et al.*, 2009), justificando o comportamento observado nas hidrólises realizadas em teores de sólidos totais de 20%.

Ao serem empregados o teste estatístico de Tukey para os experimentos de hidrólise enzimática, decidiu-se nomear cada tratamento de A até D para os ensaios H6 e H8 BEV-FSL, e de E até H para os ensaios correspondentes a BEV-FSL, e então verificar a relação entre as médias obtidas. A FIGURA 12 apresenta os dados encontrados nas correlações entre os experimentos.

Figura 12. Análise de Tukey dos experimentos de hidrólise realizados a partir do planejamento



FONTE: O autor, 2021.

Para o pré-tratamento realizado por 7,5 min, os experimentos A e B representam a hidrólise enzimática de BEV-FSL, tendo em B a adição de atividade hemicelulásica na forma da enzima Cellic HTec3. Já os experimentos E e F correspondem aos resultados da hidrólise de BEV-FSC, onde F recebeu adição de Cellic HTec3. É possível observar que houve correlação entre os substratos, o que significa que a adição de Cellic HTec3 teve impacto sobre os resultados de hidrólise, aumentando a quantidade de glicose obtida. Todavia, o desempenho de BEV-FSL em A e B não diferiu do resultado obtido com BEV-FSC. Já para os pré-tratamentos realizados por 15 min, os experimentos C e D correspondem à hidrólise enzimática de

BEV-FSL, sendo que em D houve a adição de Cellic HTec3, enquanto G e H correspondem aos resultados da hidrólise de BEV-FSC, em que H recebeu adição de Cellic HTec3. Assim, de modo análogo aos resultados anteriores, essa adição provocou um aumento no rendimento de glucose liberada, mas a presença da fração C5 em BEV-FSC (G e H) parece ter sido mais inibitória se comparados ao desempenho de BEV-FSL (C e D).

De acordo com MENG e RAGAUSKAS (2014), as hemiceluloses são geralmente depositadas na superfície externa das fibras de celulose, bem como nos poros e espaços interfibrilares. Assim, adição da enzima Cellic HTec3 mostrou-se eficiente porque permitiu a hidrólise dos fragmentos de hemicelulose presentes nos materiais tanto lavados quanto centrifugados, facilitando assim o acesso das celulasas ao material. Por outro lado, a Cellic HTec3 possui atividade celulásica residual, o que já poderia explicar o efeito sinérgico que apresentou com a Cellic CTec3. Essas hipóteses puderam ser verificadas pelas quantidades de xilose encontradas nos hidrolisados enzimáticos ao final de cada reação.

Para os substratos pré-tratados por 7,5 min foram encontrados teores de xilose de  $2,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \pm 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $6,2 \pm 0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para BEV-FSL e BEV-FSC, respectivamente. Já os valores encontrados para substratos pré-tratados por 15 min foram de  $1,78 \pm 0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $2,8 \pm 0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para BEV-FSL e BEV-FSC, respectivamente. Dessa forma, a fração C5 presente na fibra centrifugada sofreu ação da Cellic HTec3.

O planejamento experimental realizado ( $2^3$ ) possibilitou o direcionamento dos ensaios de hidrólise enzimática para uma condição que pudesse favorecer um maior rendimento de glucose a partir dos substratos pré-tratados, buscando aumentar a produção de ácido láctico na etapa subsequente de fermentação. A TABELA 8 apresenta a análise de variância dos modelos obtidos a partir dos dados experimentais. Avaliou-se, então, as influências de fatores como a enzima empregada (Cellic CTec3 e Cellic CTec3 + Cellic HTec3) e carga de sólidos totais em relação aos materiais pré-tratados que foram lavados com água ou não. As equações 9 a 12 resultaram dos experimentos realizados com BEV-FSL (9) e BEV-FSC (10) do pré-tratamento por 7,5 min, BEV-FSL (11) e BEV-FSC (12) do pré-tratamento por 15 min.

Em todos os casos, o valor de  $p$  dos ajustes foi menor do que 0,05, indicando que a hipótese do modelo é verdadeira. Os dados experimentais foram úteis para a geração do modelo matemático que foi confirmado pela significância estatística das regressões, demonstrando assim que o planejamento experimental permitiu a

maximização na quantidade de carboidratos liberados ao final da etapa de hidrólise enzimática.

Os gráficos de Pareto da FIGURA 13 apresentam as influências das variáveis de controle, enzimas e sólidos totais, sobre a quantidade de glucose obtida ao final da hidrólise de materiais pré-tratados por 7,5 min. Como esperado, a quantidade de Cellic CTec3 (x1) foi a variável de controle mais significativa do processo, e a influência predominante desta variável se deu de maneira quadrática, correspondendo a 64,01 e 63,94 pontos percentuais nos materiais lavados e centrifugados, respectivamente. Além disso, a contribuição linear da enzima também foi bastante expressiva, 27,41 e 25,31 pontos percentuais para BEV-FSL e BEV-FSC. Desta forma, o fator Cellic CTec3 é o principal responsável pelas respostas observadas nos experimentos, somando uma influência de 91,42 e 89,25 pontos percentuais para os materiais BEV-FSL e BEV-FSC, respectivamente. A segunda variável de importância é a quantidade de sólidos empregado (x2), que foi de aproximadamente 4 pontos percentuais para os dois tipos de material. Já a influência da Cellic HTec3 (x3) não foi significativa (menor que 2 pontos percentuais), mesmo para o material centrifugado onde existe a presença de oligômeros de hemiceluloses.

$$Glc (g/L) = - 17,36 (x1)^2 + 11,35 x1 + 4,24 x2 + 3,32 x3 + 2,36 x1.x2 + 0,79 x1.x3 + 2,27 x2.x3 + 52,32 \quad (9)$$

$$Glc (g/L) = - 18,36 (x1)^2 + 11,54 x1 + 4,43 x2 + 2,86 x3 + 4,22 x1.x2 + 0,17 x1.x3 + 3,32 x2.x3 + 50,73 \quad (10)$$

$$Glc (g/L) = - 10,84 (x1)^2 + 17,84 x1 + 10,95 x2 + 2,29 x3 + 5,79 x1.x2 - 0,48 x1.x3 + 2,02 x2.x3 + 57,65 \quad (11)$$

$$Glc (g/L) = - 0,30 (x1)^2 + 16,78 x1 + 10,08 x2 + 4,86 x3 + 6,30 x1.x2 - 1,47 x1.x3 + 3,04 x2.x3 + 36,58 \quad (12)$$

Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) dos modelos gerados a partir do planejamento dos experimentos de hidrólise enzimática do planejamento

log Ro	GL <sup>3</sup>	Mínimo	1Q <sup>4</sup>	Mediana	3Q <sup>5</sup>	Máximo	ERP <sup>6</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Ajustado	Valor de F	Valor de p
3,67 <sup>1</sup>	10	-0,5150	-0,3725	-0,0325	0,3950	0,5800	0,5219	0,9992	0,9986	1702	1,459 x 10 <sup>-14</sup>
3,67 <sup>2</sup>	10	-0,8775	-0,4025	0,0000	0,4963	0,9125	0,8164	0,9982	0,9969	778,9	7,208 x 10 <sup>-13</sup>
3,97 <sup>1</sup>	10	-0,9300	-0,6350	0,0000	0,5000	1,0200	0,9194	0,9989	0,9982	1337	4,867 x 10 <sup>-14</sup>
3,97 <sup>2</sup>	10	-1,0437	-0,6225	0,0000	0,6225	0,8888	0,9317	0,9988	0,9980	1207	8,156 x 10 <sup>-14</sup>

<sup>1</sup> BEV-FSL

<sup>2</sup> BEV-FSC

<sup>3</sup> Graus de Liberdade

<sup>4</sup> Primeiro Quartil,

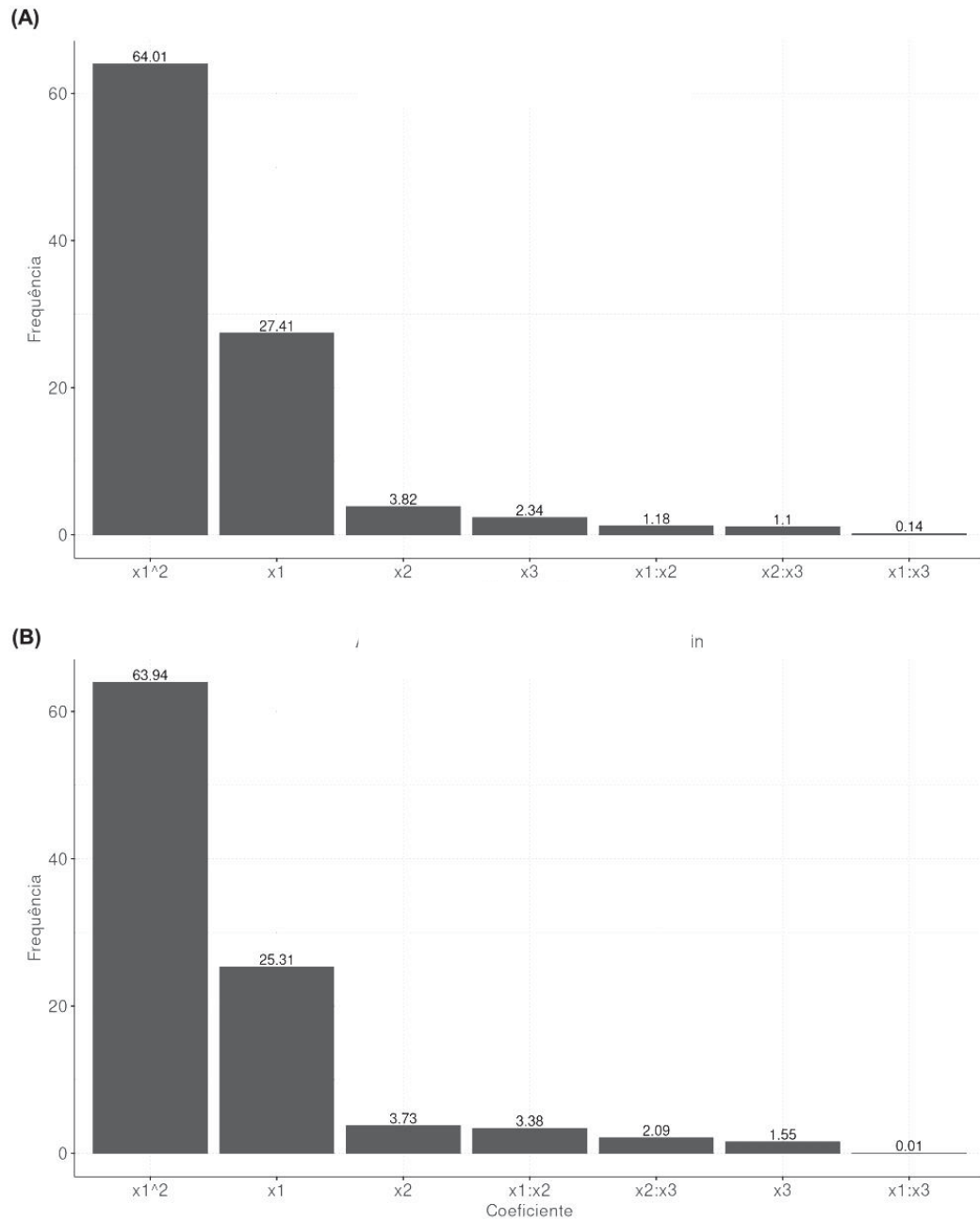
<sup>5</sup> Terceiro Quartil,

<sup>6</sup> Erro residual padrão.

FONTE: O autor, 2021.



Figura 13. Diagrama de Pareto para os modelos gerados a partir do material pré-tratados por 7,5 min



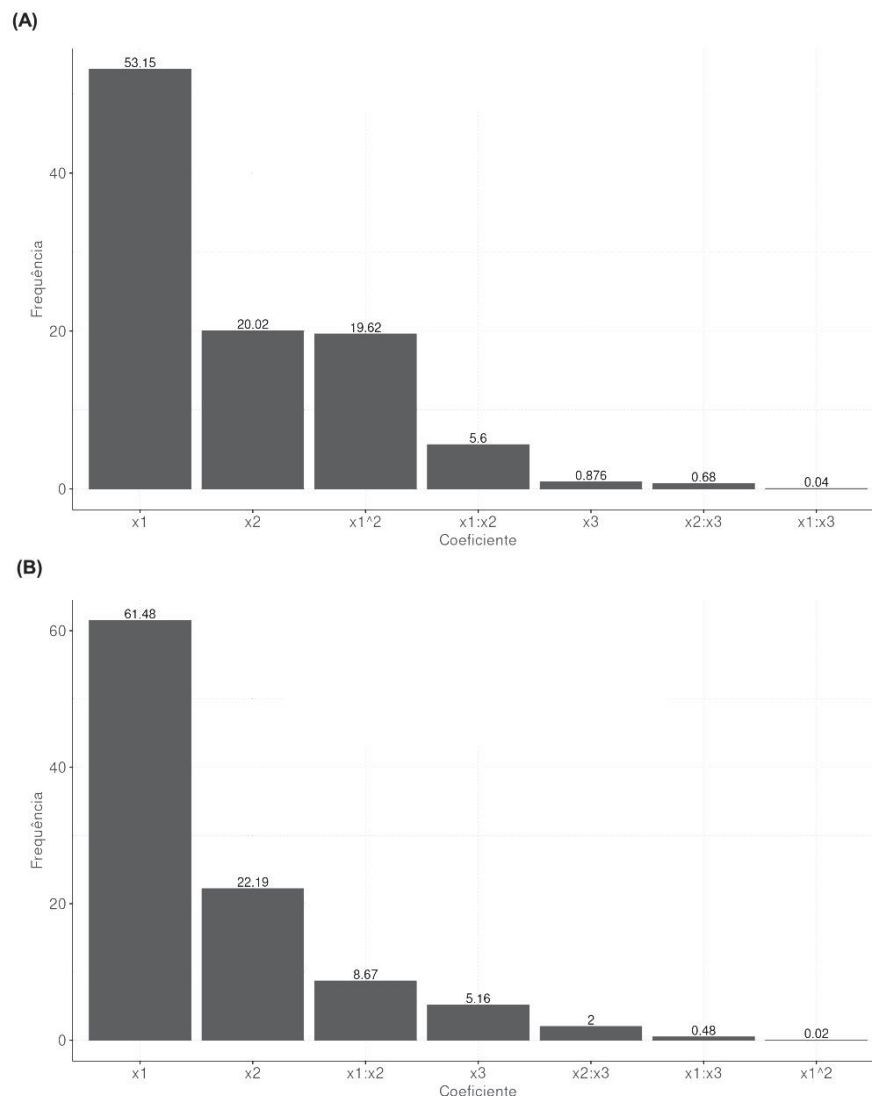
LEGENDA: BEV-FSL (A) e BEV-FSC (B), sendo  $x1$  Cellic CTec3,  $x2$  Sólidos Totais e  $x3$  Cellic Htec3

FONTE: O autor, 2021.

Os gráficos de Pareto da FIGURA 14 apresentam a influência das variáveis na quantidade de glucose ao final da hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados por 15 min. A contribuição linear da Cellic CTec3 foi a variável mais significativa do processo, tanto para BEV-FSL quanto para BEV-FSC, correspondendo a 53,15 e 61,48 pontos percentuais, respectivamente. É de se destacar que para o material

lavado a contribuição linear dos sólidos totais ( $x_2$ ) e a contribuição quadrática da enzima ( $x_1$ ) exercem a mesma influência de aproximadamente 20 pontos percentuais cada. Por outro lado, para o material centrifugado, a segunda maior influência também foi a quantidade de sólidos ( $x_2$ ), com 22,19 pontos percentuais, seguido da interação binária  $x_1x_2$ , com 8,67 pontos percentuais. Também para o tratamento de 15 min, a influência da presença de Cellic HTec3 foi pouco significativa, menor que 1 ponto percentual para material lavado e apenas 5 pontos percentuais para material centrifugado.

Figura 14. Diagrama de Pareto para os modelos gerados a partir do material pré-tratados por 15 min



LEGENDA: BEV-FSL (A) e BEV-FSC (B), sendo  $x_1$  Cellic CTec3,  $x_2$  Sólidos Totais e  $x_3$  Cellic Htec3

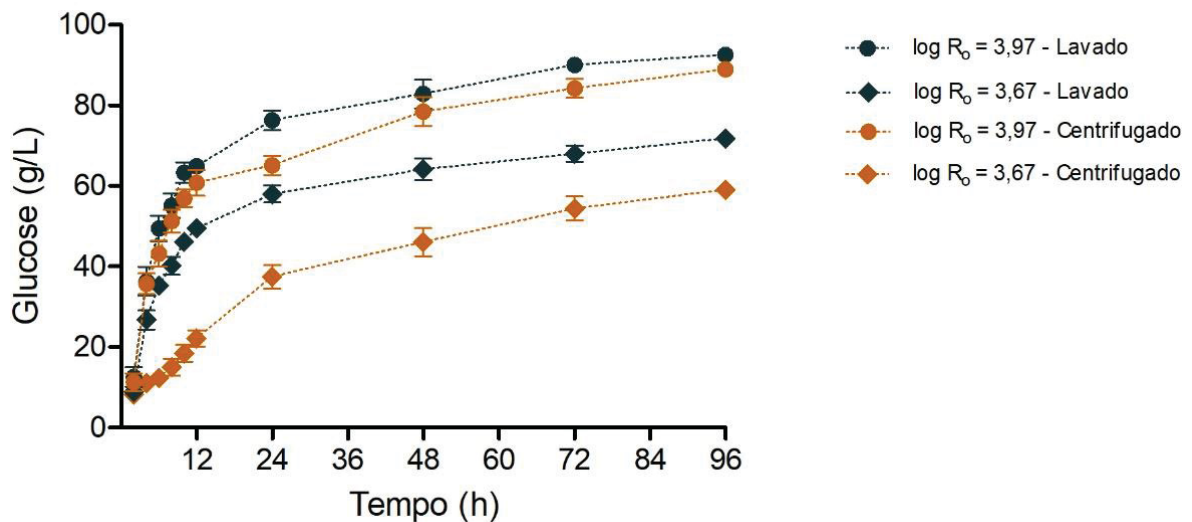
FONTE: O autor, 2021.

Quando comparados entre si em relação à quantidade final de glucose liberada, BEV-FSC tratado com maior severidade é similar à mesma condição de

hidrólise empregada em BEV-FSL do material tratado com menor severidade ( $p > 0,05$ ), o que implica dizer que a etapa de lavagem poderia ser revista e inclusive eliminada dependendo da configuração do pré-tratamento. Todavia, a fim de verificar se a eliminação dessa etapa teria impacto sobre a fermentação, em vista da eventual presença de substâncias tóxicas em concentrações inibitórias, novos experimentos de hidrólise enzimática foram realizados em reatores de maior volume útil (Infors-HT), empregando 1 L como volume de partida, 200 g de cada substrato (base seca), 12 g de Cellic CTec3 (atividade celulásica de 26 FPU  $g^{-1}$ ) e 1,2 g de Cellic HTec3 (atividade celulásica de 5 FPU  $g^{-1}$ ). Tais condições teriam sido as mesmas que entregaram o maior rendimento de hidrólise nos experimentos realizados em frascos agitados.

A FIGURA 15 apresenta as curvas de hidrólise ao longo da reação, bem como os valores de glucose obtidos (em  $g \cdot L^{-1}$ ) para cada tipo de substrato. Observou-se o mesmo perfil de curva exceto pelo aumento na quantidade de glucose obtida nos ensaios realizados no reator. Após 96 h de reação, obteve-se 71 e 59  $g \cdot L^{-1}$  de glucose para substratos pré-tratados por 7,5 min, e 92,5 e 88,9  $g \cdot L^{-1}$  para substratos pré-tratados por 15 min.

Figura 15. Curvas de hidrólise enzimática resultantes do escalonamento realizado em reator Infors



FONTE: O autor, 2021.

Os substratos lavados também apresentaram maiores rendimentos em  $g \cdot L^{-1}$  de glucose, como previsto nos ensaios realizados em frascos agitados. Entretanto, o material tratado com maior severidade mostrou-se melhor em relação à concentração

final de glucose. Isso provavelmente se deu porque o pré-tratamento mais drástico promoveu modificações mais profundas sobre o componente celulósico, levando a substratos de maior acessibilidade química (CARDONA *et al.*, 2010). Dados da literatura sugerem que a celulose amorfa, tendo maior área superficial e porosidade, apresenta maior suscetibilidade à hidrólise enzimática do que a forma cristalina (YOSHIDA *et al.*, 2008), o que pode explicar o comportamento da hidrólise nas primeiras horas de reação. Assim, o tratamento de maior severidade gerou melhores substratos para a hidrólise enzimática, apesar de seu alto teor de lignina e das modificações que esta tenha sofrido em consequência da explosão a vapor.

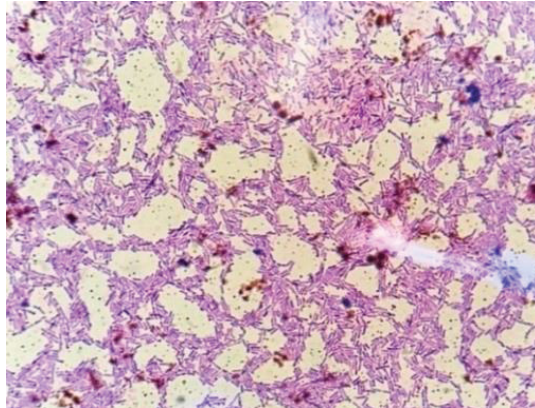
Godoy, Machado e Costa (2019) realizaram o estudo de sistemas com diferentes cargas de sólidos iniciais, considerando as operações de batelada e batelada alimentada empregando bagaço submetido a um pré-tratamento hidrotérmico a 190 °C por 10 min. As hidrólises foram realizadas por 144 h em cargas de sólidos de 5 a 20% ( $m \cdot v^{-1}$ ) e, em todos os casos, a concentração da enzima foi de 15 FPU  $g^{-1}$  de biomassa. O resultado obtido a 20% de sólidos totais foi de 95,4  $g \cdot L^{-1}$  de glucose, e para menores teores de sólidos totais (5, 10 e 15%), valores inferiores a 70  $g \cdot L^{-1}$  foram relatados. Já o processo em batelada alimentada proporcionou a entrega de 111  $g \cdot L^{-1}$  de glucose.

## 5.5 FERMENTAÇÃO

Os experimentos de fermentação foram iniciados depois que o resultado da coloração de Gram confirmou a presença de *Bacillus* com a morfologia típica da espécie. A FIGURA 16 apresenta uma imagem feita em microscópio da cepa utilizada. Notou-se que eram bactérias Gram-positivas na forma de bastonetes, sendo possível observar esporos em profusão. *B. coagulans* é um bacilo de diâmetro inferior a 1  $\mu m$ , apresenta esporo oval ou esférico (BERGEY; HOLT, 1994). Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas incorporam o corante primário e o fixador, adquirindo uma coloração violeta devido à formação de um complexo cristal violeta-iodo, insolúvel, em seus citoplasmas. A acetona utilizada para descorar a placa provocou a contração dos poros do peptidoglicano (heteropolissacarídeo constituinte da parede celular) e tornou as células impermeáveis ao complexo, assim células permanecem coradas. A retenção ou não do corante primário é, portanto, dependente das propriedades físicas e químicas das paredes celulares bacterianas tais como espessura, densidade, porosidade e integridade. Em seguida, a amostra foi tratada com um corante

secundário, a fucsina básica. Ao microscópio, as células Gram-positivas se apresentam coradas em violeta escuro e as Gram-negativas em vermelho ou rosa escuro.

Figura 16. Resultado do teste de Gram realizado nas cepas recebidas



FONTE: O autor, 2021.

#### 5.5.1 Fermentação da fração hidrossolúvel do pré-tratamento

Os hidrolisados originados durante o pré-tratamento foram fermentados tanto isoladamente quanto em mistura com os hidrolisados obtidos depois do processo de hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados (processo SHCF). Na primeira etapa as fermentações foram realizadas em separado para que fosse possível verificar a influência da destoxificação com carvão ativado sobre o processo fermentativo. Houve diferença visual na turvação dos meios (aumento da biomassa celular) e diferença significativa na produção do ácido láctico a partir das frações destoxificadas ( $p < 0,05$ ). As TABELAS 9 e 10 apresentam de forma comparativa os rendimentos obtidos a partir desses experimentos, bem como os parâmetros de fermentação.

Os teores de ácido láctico encontrados nas frações BEV-FLB foram menores do que os das frações BEV-FLD para ambas as condições de pré-tratamentos e, nos dois casos, a arabinose (em concentrações  $< 1,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foi totalmente consumida. Os meios brutos acumularam 2,3 e 2,7  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido láctico para pré-tratamentos realizados por 7,5 e 15 min, respectivamente, sendo estes valores estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), ou seja, as amostras do pré-tratamento que não passam pelo processo de destoxificação têm desempenho de fermentação semelhante. Já nas amostras destoxificadas, os teores de ácido láctico obtidos foram de 15,1 e 5,7  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente ( $p < 0,05$ ).

Tabela 9. Resultados da fermentação das frações BEV-FLB e BEV-FLD

Experimento	Produto (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>				
	Xyl	Glc	AL	Xyl <sub>R</sub>	Glc <sub>R</sub>
A <sup>2</sup>	11,2 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,6	8,9 ± 0,3	2,1 ± 0,1
B <sup>3</sup>	11,1 ± 0,2	2,3 ± 0,1	15,1 ± 0,5	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
C <sup>4</sup>	4,3 ± 0,2	2,2 ± 0,1	1,7 ± 0,4	2,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2
D <sup>5</sup>	4,3 ± 0,1	2,1 ± 0,2	5,9 ± 0,6	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1

<sup>1</sup> Xyl e Glc, xilose e glucose iniciais; AL, ácido láctico produzido; Xyl<sub>R</sub> e Glc<sub>R</sub>, xilose e glucose residuais;

<sup>2</sup> BEV-FLB do tratamento de 7,5 min;

<sup>3</sup> BEV-FLD do tratamento de 7,5 min;

<sup>4</sup> BEV-FLB do tratamento de 15 min;

<sup>5</sup> BEV-FLD do tratamento de 15 min.

FONTE: O autor, 2021.

Tabela 10. Parâmetros cinéticos resultantes da fermentação das frações BEV-FLB e BEV-FLD

Parâmetro	Y <sub>p/s</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	P (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Y <sub>x/s</sub>	(DO <sub>600nm</sub> )
A <sup>1</sup>	0,19 ± 0,3	< 0,01	0,19 ± 0,3	4,0 ± 0,3
B <sup>2</sup>	1,10 ± 0,04	0,63 ± 0,02	0,16 ± 0,04	5,9 ± 0,1
C <sup>3</sup>	0,39 ± 0,1	< 0,01	0,09 ± 0,05	4,6 ± 0,4
D <sup>4</sup>	0,86 ± 0,12	0,24 ± 0,03	0,11 ± 0,07	4,8 ± 0,6

<sup>1</sup> BEV-FLB do tratamento de 7,5 min;

<sup>2</sup> BEV-FLD do tratamento de 7,5 min;

<sup>3</sup> BEV-FLB do tratamento de 15 min;

<sup>4</sup> BEV-FLD do tratamento de 15 min.

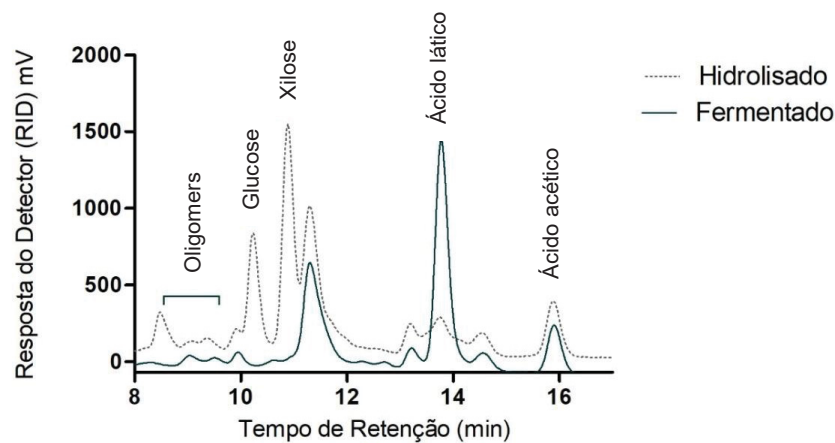
FONTE: O autor, 2021.

A FIGURA 17 apresenta o cromatograma comparativo entre os hidrolisados obtidos no pré-tratamento por 15 min antes e depois da fermentação. É possível observar a diminuição do pico de xilose e glucose na amostra e aparecimento do pico correspondente ao ácido láctico.

Oliveira *et al.* (2019) realizaram uma comparação entre meios sintéticos contendo xilose e glucose para a produção de ácido láctico, além de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana que foram obtidos a 10% de sólidos totais com 0,5% (v.v<sup>-1</sup>) HCl a 140 °C por 15 min. Esse hidrolisado, que apresentou 48 g.L<sup>-1</sup> de xilose e 7,86 g.L<sup>-1</sup> de glucose, além de 0,08 de HMF e 0,01 g.L<sup>-1</sup> furfural, foi suplementado com 20 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura como fonte de nitrogênio para o

processo fermentativo. Nessas condições, o *B. coagulans* 14-300 produziu  $56 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido láctico, que correspondeu a 87% de rendimento. No entanto, vale ressaltar que uma etapa evaporação foi adicionada para a concentração do hidrolisado, o que pode ter removido por evaporação a maior parte dos compostos furânicos de ação inibitória (Pitarelo *et al.*, 2016).

Figura 17. Cromatograma da fração BEV-FLD (15 min) antes e após a fermentação



FONTE: O autor, 2021.

Ahorsu *et al.* (2019) utilizaram *B. coagulans* DSM2314 na fermentação de hidrolisados de cascas de nozes que foram obtidos por auto-hidrólise assistida por micro-ondas. Os experimentos foram conduzidos a  $190 \text{ }^\circ\text{C}$  por até 25 min em um equipamento que possibilitava o uso de cinco reatores simultâneos. Esses autores obtiveram uma produtividade de  $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , que representou uma conversão de 93% da xilose ( $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) em ácido láctico. Além disso, observaram que concentrações de  $0,45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de furfural e  $2,42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido acético não afetaram o processo de fermentação. Todavia, não foi indicada a presença de xilooligosacarídeos no meio e os tempos de fermentação foram de até 48 h.

Ye *et al.* (2014) utilizaram *B. coagulans* J112 para fermentar hidrolisados celulósicos e hemicelulósicos de resíduos de cachos vazios das frutas do dendezeiro, cujas proporções em glucose e xilose eram diferentes (meio contendo 10 g de glucose e 100 g xilose por litro e outra contendo 50 g de glucose e 53 g xilose por litro). A cepa foi capaz de fermentar os dois hidrolisados na presença de  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de furfural, que foi parcialmente metabolizado a ácido 2-furóico.

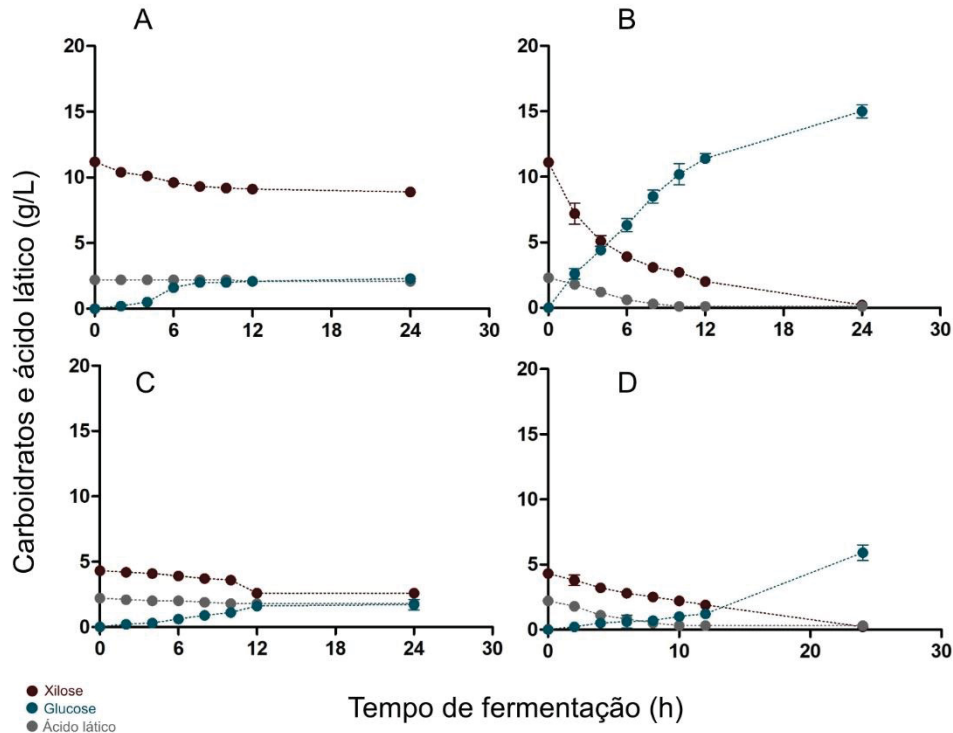
van der Pol *et al.* (2016a) realizaram a pré-cultura de *B. coagulans* DSM2314 na presença de furfural utilizando como glucose e xilose como fonte de carbono. As quantidades ensaiadas foram de 1,6 g·L<sup>-1</sup> de furfural, 0,2 g·L<sup>-1</sup> de HMF e 3,1 g·L<sup>-1</sup> de ácido acético. Apesar de terem indicado um aumento na produção de ácido láctico com a adição de furfural no meio de fermentação, esse estudo foi realizado em meio sintético, o que significa que a simulação não necessariamente reflete os efeitos de matriz que são esperados em hidrolisados hemicelulósicos. Além disso, a pré-cultura realizada na presença de furfural também não simulou o meio resultante do pré-tratamento e o aumento na produtividade não esteve diretamente ligado a esse parâmetro. Os autores propuseram que o processo fermentativo de xilose (fração C5) deva ser realizado em separado do hidrolisado enzimático contendo glucose majoritariamente.

Observou-se a partir dos testes realizados que a presença de outros compostos de degradação no BEV-FL oriundo da explosão a vapor inibiu parcialmente a produção de ácido láctico (FIGURA 18), tendo sido menor em relação à mesma amostra que passou pelo processo de destoxificação. Uma possível explicação para a formação, ainda que pequena, de ácido láctico no meio não-destoxificado seria a de que, apesar da toxicidade do furfural ser causada majoritariamente pela formação de espécies reativas de oxigênio (FERON *et al.*, 1991; ALLEN *et al.*, 2010), vários genes presentes em *B. coagulans* estão relacionados à biossíntese de enzimas capazes de reduzir a concentração dessas espécies reativas no meio, a catalase e a superóxido dismutase (CABISCOL *et al.*, 2000). Como a cepa utilizada é catalase positiva, este mecanismo pode estar envolvido na sua tolerância à presença de furfural (VAN DER POL *et al.*, 2016a).

É importante ressaltar que, no presente estudo, não foram utilizados meios sintéticos nem qualquer pré-adaptação da cultura, refletindo, portanto, a realidade para processos de produção de AL em escala industrial.



Figura 18. Cinética de fermentação das frações hidrossolúveis originadas nos pré-tratamentos



LEGENDA: Pré-tratamento realizado a 195 °C durante 7,5 min (em A, BEV-FLB; em B, BEV-FLD) e 15 min (em C, BEV-FLB; em D, BEV-FLD).

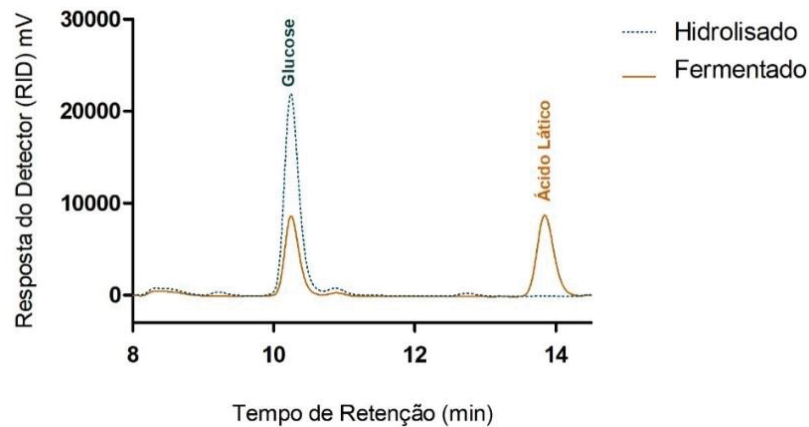
FONTE: O autor, 2021.

### 5.5.2 Experimentos de fermentação SHF e SHCF

Os hidrolisados enzimáticos das amostras foram organizados em quatro grupos, correspondentes aos materiais lavados (BEV-FSL) e centrifugados (BEV-FSC) de ambos os pré-tratamentos realizados a 195 °C por 7,5 e 15 min. A FIGURA 19 mostra o cromatograma obtido antes e depois da fermentação do hidrolisado enzimático de substratos lavados obtidos a partir do tratamento por 15 min. É possível observar que, após o processo fermentativo, houve a diminuição do pico correspondente à glucose e aparecimento do pico correspondente ao ácido lático.

Nos experimentos de cofermentação realizados em duplicatas, os hidrolisados enzimáticos dos substratos tiveram o acréscimo das respectivas frações hidrossolúveis brutas e destoxificadas correspondentes. A relação C5/C6 utilizada teve como base o estudo realizado por van der Pol *et al.* (2016a) com adaptações para os hidrolisados obtidos, sendo utilizados 10% de C5 e 90% de C6.

Figura 19. Cromatograma do hidrolisado enzimático antes e após a fermentação (SHF, 15 min)



FONTE: O autor, 2021.

As TABELAS 11 e 12 e a FIGURA 20 apresentam os resultados dos processos fermentativos e os dados cinéticos para o pré-tratamento realizado por 7,5 min, respectivamente. Todos os hidrolisados continham glucose e xilose. Em geral, a maior parte das bactérias que produzem ácido láctico não utilizam pentoses, mas as que utilizam o fazem pela via heterofermentativa, produzindo baixos rendimentos de ácido láctico e produtos indesejáveis tais como etanol e ácido acético (ABEDI; HASHEMI, 2020). Nos testes realizados, houve formação somente de ácido láctico após 24 h de fermentação, o que já era esperado em função do tipo de bactéria empregada nestes experimentos. Portanto, todos os testes ocorreram de maneira homofermentativa.

Tabela 11. Resultados obtidos na fermentação dos hidrolisados em processos SHF e SHCF (7,5 min)

Experimento	Produto (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>				
	Xyl	Glc	AL	Xyl <sub>R</sub>	Glc <sub>R</sub>
A <sup>2</sup>	2,1 ± 0,1	71,0 ± 0,4	64,2 ± 1,3	0,2 ± 0,1	17,1 ± 1,2
B <sup>3</sup>	6,4 ± 0,3	59,8 ± 0,3	48,8 ± 0,5	2,1 ± 0,3	14,3 ± 1,6
C <sup>4</sup>	1,1 ± 0,5	64,1 ± 0,2	61,4 ± 1,8	1,1 ± 0,5	3,8 ± 0,7
D <sup>5</sup>	6,9 ± 0,7	54,4 ± 0,9	4,6 ± 0,3	4,4 ± 0,9	51,9 ± 0,3

<sup>1</sup> Xyl e Glc, xilose e glucose iniciais; AL, ácido láctico produzido; Xyl<sub>R</sub> e Glc<sub>R</sub>, xilose e glucose residuais;

<sup>2</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSL;

<sup>3</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSC;

<sup>4</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSL + adição de BEV-FLD;

<sup>5</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSL + adição de BEV-FLD

FONTE: O autor, 2021.

Tabela 12. Parâmetros cinéticos da fermentação das frações BEV-FLB e BEV-FLD (7,5 min)

Parâmetro	$Y_{p/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	P (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Y_{x/s}$	(DO <sub>600nm</sub> )
A <sup>1</sup>	0,88 ± 0,01	2,68 ± 0,08	0,09 ± 0,02	14,6 ± 0,8
B <sup>2</sup>	0,74 ± 0,01	2,03 ± 0,03	0,09 ± 0,01	15,3 ± 0,9
C <sup>3</sup>	0,93 ± 0,02	2,55 ± 0,11	0,07 ± 0,02	16,2 ± 0,4
D <sup>4</sup>	0,07 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,07 ± 0,01	3,7 ± 0,2

<sup>1</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSL;

<sup>2</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSC;

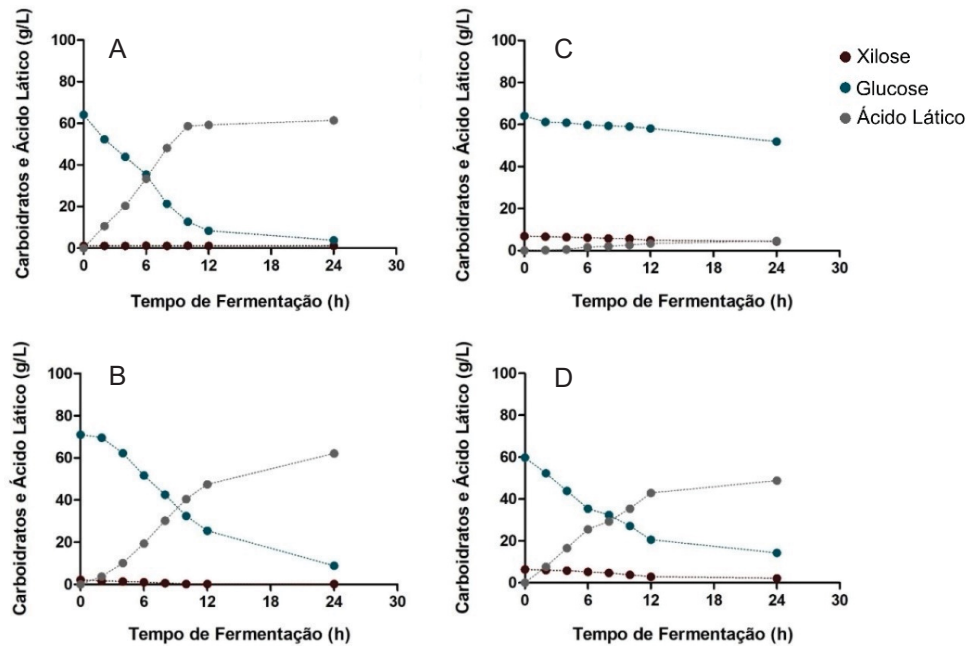
<sup>3</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSL + adição de BEV-FLD;

<sup>4</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSL + adição de BEV-FLD

FONTE: O autor, 2021.

Os valores de produtividade em ácido láctico para o pré-tratamento realizado por 7,5 min foram de 2,68 e 3,06 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> para os hidrolisados dos materiais lavados com água (BEV-FSL) que foram fermentados na ausência e na presença da fração hidrossolúvel (C5) destoxificada (BEV-FLD), respectivamente. Já para os hidrolisados dos materiais centrifugados (BEV-FSC) e a fração C5 não destoxificada (BEV-FLB), as produtividades foram de 2,03 e 0,19 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. Com base nesses resultados, as conversões atingidas foram de 0,88 e 0,74 g de ácido láctico por grama de carboidratos para as duas primeiras configurações, enquanto, para as duas últimas, as conversões foram de 0,95 e 0,07 g·g<sup>-1</sup>, respectivamente. Sendo assim, *B. coagulans* DSM 2314 consegue produzir ácido láctico (4,6 g·L<sup>-1</sup>) em meio aos compostos fenólicos, todavia, seu desempenho é muito lento quando comparado aos meios em que tais compostos não estão presentes. Esse fato foi observado pela baixa conversão dos carboidratos do meio bem como pela baixa densidade de células ao final do processo fermentativo. Então, a diminuição do crescimento celular e eficiência do processo de fermentação pode ser atribuída ao acréscimo da fração hidrossolúvel do pré-tratamento que não passou pelo processo de destoxificação. A presença de ácidos carboxílicos e compostos fenólicos no meio o tornou tóxico à bactéria, isso porque tais compostos podem atravessar a membrana celular das células, resultando na diminuição do pH intracelular e causando injúria nas funções celulares, uma vez que a energia obtida pelo micro-organismo passa a ser utilizada para manter a homeostase ao invés de ser investida no crescimento celular, além da desnaturação de proteínas (inibição do metabolismo) e morte celular (TRCEK; MIRA; JARBOE, 2015; OTHMAN *et al.*, 2017; ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2021).

Figura 20. Cinética de fermentação das frações hidrossolúveis originadas no pré-tratamento e nos ensaios de hidrólise enzimática (7,5 min)



LEGENDA: Processo SHF hidrolisado enzimático do BEV-FSC (A), processo SHCF com adição BEV-FLB ao hidrolisado enzimático BEV-FSL (B), processo SHF do hidrolisado enzimático BEV-FSL (C) e processo SHCF com adição da fração BEV-FLD (D).

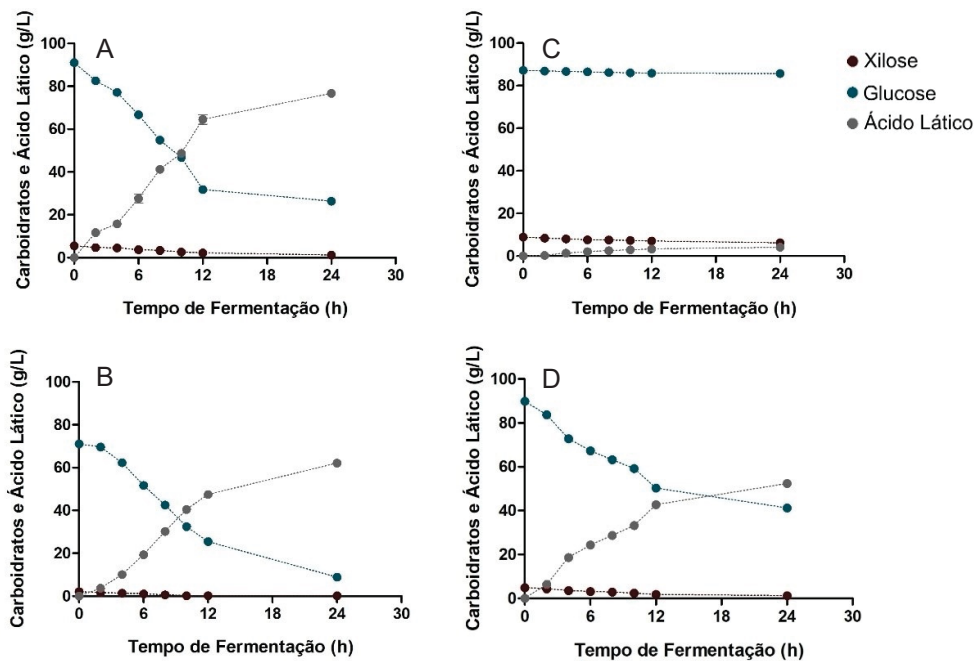
FONTE: O autor, 2021.

Cubas-Cano *et al.* (2020) estudaram o efeito de compostos inibitórios sobre duas cepas de *B. coagulans* (A162 e DSM2314) usando meios sintéticos e hidrolisados oriundos da explosão a vapor de resíduos de plantas de jardinagem (180 °C por 10 min com 60 mg·g<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Os hidrolisados continham 5 g·L<sup>-1</sup> de glucose e 15 g·L<sup>-1</sup> de xilose, além de, respectivamente: 3,4 e 4,6 g·L<sup>-1</sup> de arabinose; 0,2 e 4,6 g·L<sup>-1</sup> de furfural; 0,23 e 4,6 g·L<sup>-1</sup> de HMF; 1,15 e 4,6 g·L<sup>-1</sup> de ácido acético; e 0,23 e 4,6 g·L<sup>-1</sup> de ácido fórmico. Os meios sintéticos continham 1,0 e 4,6 g·L<sup>-1</sup> dos ácidos acético e fórmico, porém, não foram testados os compostos fenólicos gerados no processo de explosão a vapor. As produtividades encontradas para as cepas A162 e DSM2314 foram de 2,1 e 1,8 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>, respectivamente.

A FIGURA 21 e as TABELAS 13 e 14 apresentam os resultados do processo fermentativo e os dados cinéticos para o pré-tratamento realizado por 15 min, respectivamente. Os valores de produtividade de ácido láctico foram de 2,37 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> e 3,20 g·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> para os hidrolisados dos materiais lavados (BEV-FSL) que foram fermentados na ausência e na presença da fração C5 destoxificada (BEV-FLD), respectivamente, que resultaram em conversões de 0,61 g e 0,78 g de ácido láctico por

g de carboidratos. Por outro lado, as produtividades oriundas de hidrolisados de substratos centrifugados (BEV-FSC) e da fração hidrossolúvel não destoxificada (BEV-FLB) foram de  $2,19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  e  $0,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , cujas conversões foram de 0,54 e 0,04 g de ácido láctico por g de carboidrato, respectivamente. Levando-se em consideração os resultados acima, é possível assumir que *B. coagulans* DSM 2314 utilizado nesse trabalho é capaz de assimilar xilose (HOLZAPFEL; WOOD, 2014) e o acréscimo dela ao meio de fermentação mostrou-se mais eficiente quando oriunda da fração destoxificada.

Figura 21. Cinética de fermentação das frações hidrossolúveis originadas no pré-tratamento e nos ensaios de hidrólise enzimática (15 min)



LEGENDA: Processo SHF hidrolisado enzimático do BEV-FSC (A), processo SHCF com adição BEV-FLB ao hidrolisado enzimático BEV-FSL (B), processo SHF do hidrolisado enzimático BEV-FSL (C) e processo SHCF com adição da fração BEV-FLD (D).

FONTE: O autor, 2021.

A remoção de compostos tóxicos aos micro-organismos, como em outros processos fermentativos, pode aumentar a produtividade e o rendimento do processo e isso foi observado ao comparar-se as amostras destoxificadas com as que não passaram pelo processo de destoxificação. Comportamento similar foi encontrado no processo SHCF em todos os casos.

Tabela 13. Resultados obtidos na fermentação dos hidrolisados em processos SHF e SHCF (15 min)

Exp	Produto (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>				
	Xyl	Glc	AL	Xyl <sub>R</sub>	Glc <sub>R</sub>
A <sup>2</sup>	0,9 ± 0,7	93,0 ± 1,8	56,9 ± 1,2	1,3 ± 0,7	34,6 ± 1,7
B <sup>3</sup>	4,9 ± 0,9	89,9 ± 1,6	52,4 ± 0,8	2,4 ± 0,8	42,0 ± 1,1
C <sup>4</sup>	5,5 ± 0,6	91,0 ± 1,4	76,7 ± 1,4	1,2 ± 0,3	26,4 ± 0,2
D <sup>5</sup>	8,9 ± 0,9	87,2 ± 0,9	4,1 ± 0,5	6,2 ± 0,6	85,7 ± 0,4

<sup>1</sup> Xyl e Glc, xilose e glucose iniciais; AL, ácido lático produzido; Xyl<sub>R</sub> e Glc<sub>R</sub>, xilose e glucose residuais;

<sup>2</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSL;

<sup>3</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSC;

<sup>4</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSL + adição de BEV-FLD;

<sup>5</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSL + adição de BEV-FLD

FONTE: O autor, 2021.

Tabela 14. Parâmetros cinéticos da fermentação das frações BEV-FLB e BEV-FLD (15 min)

Parâmetro	Y <sub>p/s</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	P (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Y <sub>x/s</sub>	(DO <sub>600nm</sub> )
A <sup>1</sup>	0,61 ± 0,01	2,37 ± 0,07	0,08 ± 0,01	14,1 ± 0,3
B <sup>2</sup>	0,55 ± 0,01	2,19 ± 0,05	0,08 ± 0,03	15,9 ± 0,4
C <sup>3</sup>	0,78 ± 0,02	3,20 ± 0,08	0,08 ± 0,01	16,0 ± 0,7
D <sup>4</sup>	0,04 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,07 ± 0,01	3,3 ± 0,2

<sup>1</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSL;

<sup>2</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSC;

<sup>3</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSL + adição de BEV-FLD;

<sup>4</sup> Hidrolisado enzimático da fração BEV-FSL + adição de BEV-FLD

FONTE: O autor, 2021.

Tais valores são compatíveis com os encontrados por van der Pol *et al.* (2016b) utilizando *B. coagulans* DSM2314. No entanto, esses autores utilizaram meio contendo glucose e xilose (72 g.L<sup>-1</sup> e 24 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, para 96 g.L<sup>-1</sup> de carboidratos totais) e obtiveram 59,3 g.L<sup>-1</sup> de ácido lático após 29 h de fermentação. Em outro estudo, van der Pol, Eggink e Weusthuis (2016c) utilizaram a explosão a vapor como pré-tratamento, empregando 170 °C por 15 min com a adição de 0,72% (m.m<sup>-1</sup>) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A partir da hidrólise enzimática do material pré-tratado e usando a cepa DSM2314 de *B. coagulans* em processo SSF, 58,2 g.L<sup>-1</sup> de ácido lático foram obtidos, que representa 73% de conversão e 1,81 g.L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> de produtividade. Com base nesses rendimentos, foi concluído que o processo ainda carecia de otimização

para que pudesse ser competitivo, principalmente porque o processo demorou 37 h no total.

No processo SSF desenvolvido por van der Pol *et al.* (2016b) para a produção de ácido láctico, uma pré-sacarificação do meio por 4 a 6 h foi inserida antes da introdução de um inóculo (5% v·v<sup>-1</sup>) pré-cultivado na presença de furfural. A enzima utilizada no processo de pré-sacarificação (Genencor GC220) continha xilanases e endoglucanases, com atividade celulásica total de 15 FPU g<sup>-1</sup> de substrato), cuja temperatura e pH ótimos de trabalho eram de 50 °C e 5,0, respectivamente. Já os substratos utilizados no ensaio foram obtidos a partir da explosão a vapor de bagaço de cana (170 °C por 15 min, com 0,72 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por grama de bagaço). Uma produção de 70,4 g·L<sup>-1</sup> de ácido láctico foi atingida, representando 89,7% de conversão dos carboidratos com uma produtividade estimada em 0,98 g·L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Nesse caso, o tempo total de hidrólise e de fermentação foi de 68 h. Dados da literatura relatam fermentações de até 50 h (ZHANG *et al.*, 2020) para concentrações superiores a 90 g·L<sup>-1</sup> de carboidratos.

A remoção de compostos tóxicos aos micro-organismos, como em outros processos fermentativos, pode aumentar a produtividade e o rendimento do processo e isso foi observado ao comparar-se as amostras destoxificadas com as que não passaram pelo processo de destoxificação. Comportamento similar foi encontrado no processo fermentativo envolvendo os hidrolisados do material tratado com menor severidade.

A presença de xilo-oligosacarídeos nos hidrolisados hemicelulósicos (BEV-FL) foi caracterizada por HPLC (cromatografia de ânions) antes e depois do processo fermentativo (FIGURA 22). Destaca-se que o sistema cromatográfico conseguiu separar em duas regiões distintas os monossacarídeos e os oligômeros. Assim, foi possível fazer uma análise quantitativa destes componentes. Como a região de monossacarídeos foi predominante, conclui-se de que o processo de hidrólise das hemiceluloses foi efetivo. Os valores obtidos para cada oligômero (em mg·L<sup>-1</sup>) estão apresentados na Tabela 15 e fazem referência ao processo de pré-tratamento realizado por 7,5 min. A fração BEV-FLB do pré-tratamento apresentou quantidades de xilobiose e xilotriose na ordem de 56 mg·L<sup>-1</sup>, seguido de traços de xilotetraose e xilopentaose. Percebe-se que a destoxificação por adsorção em carvão ativado diminuiu pouco a quantidade destes oligômeros, e não houve consumo efetivo de oligômeros durante a fermentação dessa fração. Por outro lado, a fração destoxificada

(BEV-FLD) não apresentou oligômeros, indicando que o microrganismo de alguma maneira conseguiu processar estes carboidratos. Já a fração líquida resultante do tratamento por 15 min apresentou teores inferiores a  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de oligossacarídeos.

Tabela 15. Teores de xilo-oligossacarídeos encontrados na fração BEV-FL ( 7.5 min) ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )

<b>Analito</b>	<b>BEV-FLB</b>	<b>BEV-FLD</b>	<b>BEV-FLB Fermentada</b>	<b>BEV-FLD Fermentada</b>
Xilobiose	$56,6 \pm 0,3$	$44,6 \pm 0,1$	$43,6 \pm 0,1$	nd <sup>1</sup>
Xilotriose	$56,5 \pm 0,2$	$33,8 \pm 0,3$	$42,1 \pm 0,2$	nd
Xilotetraose	$43,0 \pm 0,5$	$34,8 \pm 0,1$	$38,6 \pm 0,1$	nd
Xilopentaose	$13,6 \pm 0,2$	$13,1 \pm 0,2$	$0,0 \pm 0,1$	nd

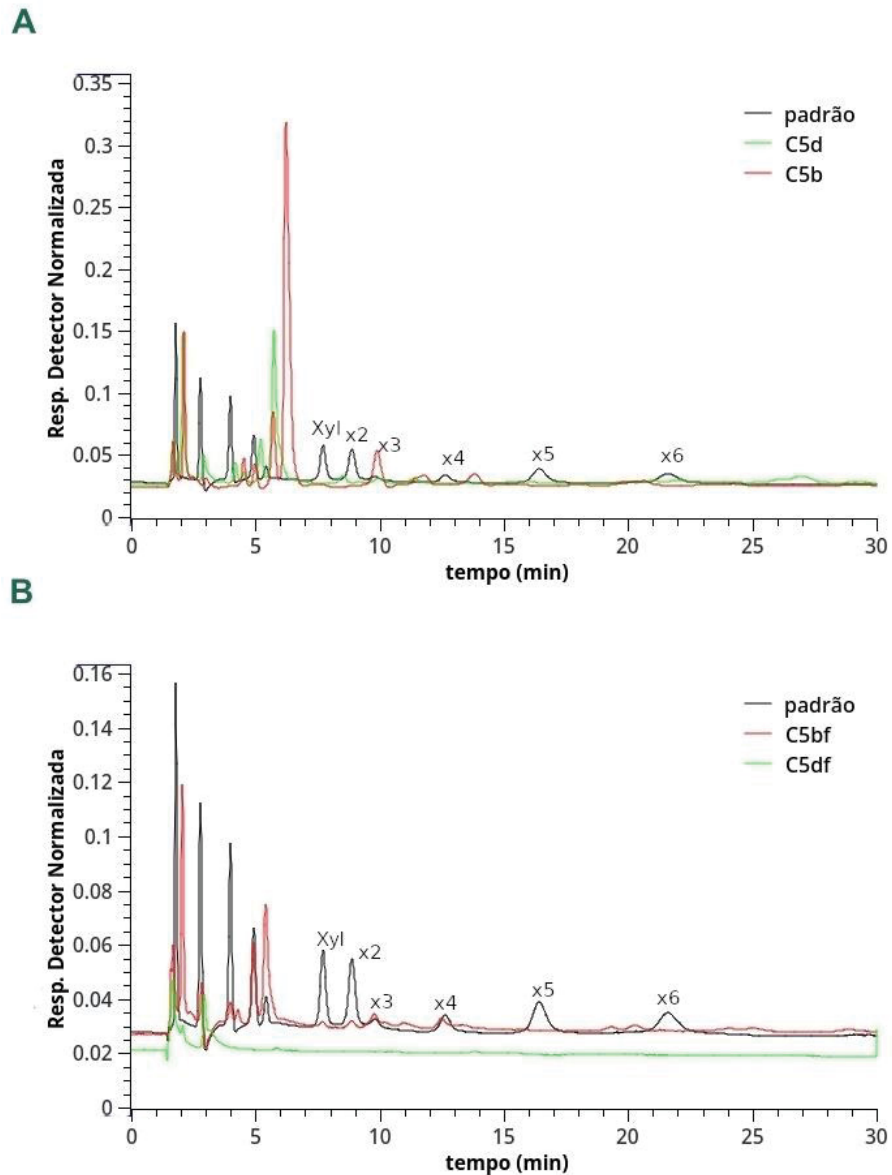
<sup>1</sup> Não detectado.

FONTE: O autor, 2021.

A capacidade de bactérias do gênero *Bacillus* em produzir xilanases já está bem caracterizada na literatura (CHOUDHURY *et al.*, 2006; RASHID; SOHAIL, 2021). Portanto, é possível que a cepa DSM2314 de *B. coagulans* tenha produzido no meio enzimas capazes de hidrolisar xilo-oligossacarídeos. Todavia, a quantidade encontrada desse analitos na fração C5 derivada do pré-tratamento a  $195 \text{ }^\circ\text{C}$  por 7,5 min foi inferior a  $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , o que significa que esse parâmetro não apresentou grande influência sobre o processo de produção de ácido lático a partir dos hidrolisados obtidos na explosão do bagaço de cana neste trabalho.



Figura 22. Cromatograma da fração líquida antes e depois dos processos de destoxificação e fermentação



LEGENDA: Em A (7,5 min), B (15 min), sendo C5d (BEV-FLD), C5b (BEV-FLB), C5df (BEV-FLD) fermentada, C5bf (BEV-FLB) fermentada.

FONTE: O autor, 2021.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi demonstrado, a partir dos ensaios realizados, que o pré-tratamento por explosão a vapor produz substratos distintos quando empregados maiores tempos de residência no reator. Assim, os substratos tratados com maior severidade e lavados com água apresentaram maior concentração de glucose ao fim da hidrólise enzimática. Após 96 h de hidrólise dos substratos lavados com água ou apenas centrifugados, foram produzidos 71,0 e 59,8 g·L<sup>-1</sup> de equivalentes de glucose (majoritariamente glucose) para 7,5 min, e 93,0 e 89,9 g·L<sup>-1</sup> para 15 min, respectivamente. Os hidrolisados produzidos a partir dos substratos que não passaram por processo de lavagem (aqueles que foram apenas centrifugados) tiveram desempenho similar durante os processos de fermentação. Isso indica que, para a hidrólise enzimática de materiais pré-tratados com menor severidade, essa etapa poderá ser eliminada, reduzindo o consumo de água e diminuindo o custo operacional do processo. Já para os materiais tratados com maior severidade, há a necessidade de lavagem com água para se alcançar maiores rendimentos no processo fermentativo.

Constatou-se que o uso direto das frações hidrossolúveis do pré-tratamento, tais como saem do reator, retardam a produção de ácido láctico durante o processo de fermentação, fazendo-se necessária a realização de um processo de destoxificação. O uso de carvão ativado como agente de adsorção de compostos inibitórios mostrou-se efetivo e proporcionou a redução de mais de 55% do ácido acético presente nos hidrolisados oriundos dos pré-tratamentos realizados. Além disso, 97,53% e 98,06% de furfural e 97,46% e 97,92% de HMF também foram removidos das frações hidrossolúveis dos pré-tratamentos realizados por 7,5 e 15 min, respectivamente. As amostras destoxificadas, a fermentação por *B. coagulans* resultou na produção de 15,1 e 5,9 g·L<sup>-1</sup> de ácido láctico.

Os maiores rendimentos em ácido láctico foram obtidos a partir dos hidrolisados enzimáticos de materiais lavados com água. Foi possível obter 64,2 g·L<sup>-1</sup> de ácido láctico pelo processo SHF partindo-se da explosão realizada com maior severidade, e 61,4 g·L<sup>-1</sup> pelo processo SHCF. Já para as amostras tratadas com menor severidade, obteve-se 56,9 g·L<sup>-1</sup> no processo SHF e 76,7 g·L<sup>-1</sup> no processo SHCF. Assim, ambas as frações puderam ser utilizadas para a produção de ácido láctico.

Para continuidade desse estudo, sugere-se que sejam aplicados maiores tempos de fermentação (> 24 h), bem como ensaios onde a fermentação seja feita de forma simultânea ao processo de hidrólise (SSCF). Outro aspecto interessante seria um amplo estudo dos compostos inibitórios e sua relação com o metabolismo de *B. coagulans* na produção de ácido láctico, podendo-se inclusive realizar uma pré-adaptação do microrganismo à composição da fração hidrossolúvel.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M. A.; SONOMOTO, K. Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid. **Journal of Biotechnology**, v. 236, p. 176-192, 2016.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. **Journal of Biotechnology**, n. 156, p. 286-301, 2011.

\_\_\_\_\_. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 877-902, 2013.

ADSUL, M. G. *et al.* Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.62, p.6-10, 2005.

AGBOR, V. B. *et al.* Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.

AGUILAR, A.; TWARDOWSKI, T.; WOHLGEMUTH, R. Bioeconomy for sustainable development. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 8, 2019.

AHORSU, R. *et al.* Microwave processes: A viable technology for obtaining xylose from walnut shell to produce lactic acid by *Bacillus coagulans*. **Journal of Cleaner Production**, v. 231, p. 1171-1181, 2019.

ALLEN, S. A. *et al.* Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, n.3, v.2, p.2-10, 2010.

ALMEIDA, J.R.M. *et al.* Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, n. 82, p. 340–349, 2007.

ÁLVAREZ, C. *et al.* Optimized use of hemicellulose within a biorefinery for processing high value-added xylooligosaccharides. **Industrial Crops and Products**, v. 99, p.41-48, 2017.

ANDRADE, L. P. *et al.* Influence of sugarcane bagasse variability on sugar recovery for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 75–81, 2017.

ASK, M. *et al.* The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 22, 2013.

ATELGE, M. R. *et al.* A critical review of pretreatment technologies to enhance anaerobic digestion and energy recovery. **Fuel**, v. 270, p. 117494, 2020.

AULITTO, M. *et al.* Seed culture pre-adaptation of *Bacillus coagulans* MA-13 improves lactic acid production in simultaneous saccharification and fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 45, p. 1-11, 2019.

AUXENFANS, T. *et al.* Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 36, 2017.

BARHOUM, A. *et al.* Plant celluloses, hemicelluloses, lignins, and volatile oils for the synthesis of nanoparticles and nanostructured materials. **Nanoscale**, v.1, n. 12, 22845-22890, 2020.

BATALHA, L. A. R. *et al.* Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. **Bioresource Technology**, v. 180, n.1, p. 97-105, 2015.

BERGEY, D. H.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9th Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

BORAND, M. N.; KARAOSMANOĞLU, F. Effects of organosolv pretreatment conditions for lignocellulosic biomass in biorefinery applications: A review. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 10, n. 3, p. 33104, 2018.

BUNTERNGSOOK, B. *et al.* Development of tailor-made synergistic cellulolytic enzyme system for saccharification of steam exploded sugarcane bagasse. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 4, p. 390–396, 2018.

BRIENZO, M. *et al.* Sugarcane bagasse hemicellulose properties, extraction technologies and xylooligosaccharides production. In: RILEY, G. L. **Food Waste. Nova Science Publishers**, 2016. Cap. 8. p. 155-188, 2016a.

BRIENZO, M. *et al.* Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples, **Renewable Energy**, p.1-29, 2017.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, n. 3, v.1, p.3-8, 2000.

CANILHA, L. *et al.* Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v.44, p.48-54, 2010a.

CANILHA, L. *et al.* Ethanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.161, p.84-92, 2010b.

CANILHA, L. *et al.* Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic

saccharification, and ethanol fermentation. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

CANTU-JUNGLES, T. M. *et al.* Isolation and characterization of a xylan with industrial and biomedical applications from edible açai berries (*Euterpe oleraceae*). **Food Chemistry**, v. 221, p.1595-1597, 2017.

CARVALHO, G. B. M. *et al.* Comparison of different procedures for the detoxification of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate for use in fermentative processes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 152-157, 2006.

CARVALHO, M. L. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2011.

CARVALHO, J. C. M., SATO, S. Fermentação Descontínua Alimentada. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, Edgar Blücher, v.2, p. 205-222, 2001.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98 p. 2415-2457, 2007.

CAVALCANTE, P. M. M.; SILVA, R. L.; FREITAS, J. J. R.; FREITAS, J. C. R.; FILHO, J. R. F. Proposta de Preparação e Caracterização de Ésteres: um Experimento de Análise Orgânica na Graduação. **Educación Química**, v. 26, pp. 319-329, 2015.

CHANDRA, R. *et al.* Improving biodegradability and biogas production of wheat straw substrates using sodium hydroxide and hydrothermal pretreatments. **Energy**, v. 43, p. 273-282, 2012.

CHIARAMONTI, D. *et al.* Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass and Bioenergy**, v.46, p. 25-35, 2012.

CHORNET, E.; OVEREND, R. P. Phenomenological kinetics and reaction engineering aspects of steam/aqueous treatments. **Fundamental and Applied Limnology**, p. 21-58, 1991.

COMA, M. *et al.* Organic waste as a sustainable feedstock for platform chemicals. **Faraday Discussions**, v. 202, p. 175-195, 2017.

CONAB. (Companhia Nacional de Abastecimento). **Observatório Agrícola**. Acomp. safra bras. cana, v. 7 - Safra 2019/20, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-58, agosto de 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acessado em 15 jun 2020.

CONNOLLY, E.; ABRAHAMSSON, T.; BJÖRKSTÉN, B. Safety of D(-)-Lactic Acid Producing Bacteria in the Human I... : *Journal of Pediatric Gastroenterology and*

Nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition.**, v. 41, n. 4, p. 489-492, 2005.

CORDEIRO, G. C.; TOLEDO FILHO, R. D.; FAIRBAIRN, E. M. R. Influência da substituição parcial de cimento por cinza ultrafina da casca de arroz com elevado teor de carbono nas propriedades do concreto. **Ambiente Construído**, v.9, n.4, p.99-107, 2009.

DE LIMA, E. E. *et al.* Produção de etanol de segunda geração proveniente do bagaço de pendúculos do caju. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 2, p. 26-35, 2015.

DEL RIO, J. C., *et al.* Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322–338, 2015.

DEMIRBAS, A. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 157, n. 2–3, p. 220–229, 2008.

D'HONT, A. *et al.* Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome**, v. 41, n. 2, p. 221–225, 1998.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Gcb Bioenergy**, v. 1, n. 1, p.2-17, 2009.

DORNATH, P.; FAN, W. Dehydration of fructose into furans over zeolite catalyst using carbon black as adsorbent. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 191, p. 10–17, 2014.

DRAGO, L.; VECCHI, E. D. Should *Lactobacillus sporogenes* and *Bacillus coagulans* Have a future? **Journal of Chemotherapy**, v. 21, p. 371-377, 2009.

DUARTE, L.C., CAVALHEIRO, F.; NEVES, I.; GÍRIO, F. M. Effects aliphatic acids, furfural and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p.413-425, 2005.

DUTTA, P. *et al.* Randomised controlled clinical trial of *Lactobacillus sporogenes* (*Bacillus coagulans*), used as probiotic in clinical practice, on acute watery diarrhoea in children. **European Journal TMIH**, v. 16, n. 5, p. 555-561, 2011.

ERIKSSON, T.; KARLSSON, J.; TJERNED, F. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.101, p.41-60, 2002.

EWANICK, S.; BURA, R. The effect of biomass moisture content on bioethanol yields from steam pretreated switchgrass and sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 2651-2658, 2011.

FANG, Z.; QI, X. Production of Platform Chemicals from Sustainable Resources. [s.l.] **Springer**, 2017.

FERON, V. J. *et al.* Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. **Mutation Research.**, n. 259, v.3, p.363-385, 1991.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. DA; SILVA, F. DE C. DA. Potentiality and opportunity in the chemistry of sucrose and other sugars. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623–638, 2009.

FOCKINK, D. H.; SÁNCHEZ, J. H.; RAMOS, L. P. Comprehensive analysis of sugarcane bagasse steam explosion using autocatalysis and dilute acid hydrolysis ( $H_3PO_4$  and  $H_2SO_4$ ) at equivalent combined severity factors. **Industrial Crops and Products.**, v. 123, n.1, p. 563-572, 2018.

GHAFFAR, T. *et al.* Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences.**, v.7, n.2, p. 222-229, 2014.

GAMBARATO, B. C. **Isolamento e caracterização de ligninas de palha de açúcar. Tese.** Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (USP), 108p., 2014.

GÍRIO, F. M. *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4775-4800, 2010.

GLOBAL VIEW RESEARCH. **Lactic Acid Market Size, Share & Trend Analysis Report by Raw Material** (Sugarcane, Cor, Cassava), by Application (Industrial, F&B, Pharmaceuticals, Personal Care, PLA), and Segment Forecasts, 2018-2025. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market>. Acesso em: 10 Set. 2020.

GODOY, C. M.; MACHADO, D. L.; COSTA, A. C. Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse – Assays and modeling. **Fuel**, n. 253, p. 392-399, 2019.

GOLBERG, A. *et al.* Proposed design of distributed macroalgal biorefineries: thermodynamics, bioconversion technology, and sustainability implications for developing economies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 8, p. 67–82, 2014.

GONZÁLEZ, M. I. *et al.* Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 553-561, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.06.021>. Acesso em: 07 Ago 2020.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 2, p. 122–7, abr. 2002.

GUO, G. L. *et al.* Characterization of dilute acid pretreatment of silver grass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 6046–53. 2008.



GUO, W. *et al.* Construction of a constitutively expressed homo-fermentative pathway in *Lactobacillus brevis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 15, p.6641-6650, 2014.

GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN, J. Poly(lactic acid) fiber: An overview. **Progress in Polymer Science**. v.32, n.4, p. 455-482, 2007.

HAHN-HAGERDAL, B. *et al.* Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v.24, p. 549-556, 2011.

HARUN, R.; LIU, B.; DANQUAH, M. K. Analysis of Process Configurations for Bioethanol Production from Microalgal Biomass. **Progress in Biomass and Bioenergy Production**, p. 395-408, 2011.

HAZELWOOD, G. P.; GILBERT, H. J. **Hemicellulose and Hemicellulases**, edited by MP Coughlan & GP Hazelwood London University Press, 1993.

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

HEIDORNE, F. O. *et al.* No Title. **Enzyme and Microbial Technology**., v. 35, p. 436, 2006.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos, em AQUARONE, E.; BORZANI, E.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA., v. 2, 2001.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26 n. 2-4, p. 87-107, 2000.

IGLESIAS, J. *et al.* Advances in catalytic routes for the production of carboxylic acids from biomass: a step forward for sustainable polymers. **Chemical Society Reviews**., v.49, n.16, p. 5704-5771, 2020.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS-ICMSF. **Microorganism in foods**. 1: Their significance and methods of enumeration. 2a ed. Toronto: University of Toronto Press, 436p, 1978.

IROBA, K. L. *et al.* Pretreatment and fractionation of barley straw using steam explosion at low severity factor. **Biomass and Bioenergy**, v.66, p.286-300, 2014.

IRVINE, J. E. Saccharum species as horticultural classes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 2, p. 186–194, 1999.

JAHNAVI, G. *et al.* Status of availability of lignocellulosic feed stocks in India: Biotechnological strategies involved in the production of Bioethanol. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 798–820, 2017.

JAMBO, S. A. *et al.* A review on third generation bioethanol feedstock. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 65, p. 756–769, 2016.

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 2013.

KAMM, B.; GRUBER, P. R.; KAMM, M. **Biorefineries: Industrial processes and products: Status quo and future directions**, v. I e II. Weinheim: Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co., 2006.

KLASSON, K.T. *et al.* Simultaneous detoxification, saccharification, and ethanol fermentation of weak-acid hydrolyzates. **Industrial Crops and Products**, n. 49, p. 292– 298, 2013.

KLEBE, G. Optical Activity and Biological Effect. In: Klebe, G. **Drug Design**. Springer, Berlin, cap.5, p. 89-110, 2013.

KIM, S. R. *et al.* Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* forenhanced xylose metabolism. **Biotechnology Advances**, v.31, p.851-861, 2013.

KO, J. K. *et al.* Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 10, p. 4201– 4212, 2015.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica, v.1, p.28-33, 2008.

KRISHNA, B. S. *et al.* Industrial production of lactic acid and its applications. **International Journal of Biotech Research**. v.1, n.1, p.42-54, 2018.

KUMAR, R. *et al.* Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v.100, p.3948-3962, 2009.

KUHAD, R. C. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, p. 4950–4962, 2011.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.

LEITÃO, M. C. A., SILVA, M. L. A., JANUÁRIO, M. I. N., AZINHEIRA, H. G., Galacturonic acid in pectic substances of sunflower head residues: quantitative determination by HPLC. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p.165-169, 1995.

LI, Y. C. *et al.* Utilization of pyrolytic char derived from bamboo chips for furfural removal: Kinetics, isotherm, and thermodynamics. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 38, p. 1520-1529, 2016.

LÓPEZ-LINARES J. C. *et al.* Hemicellulose-derived sugars solubilisation of rape straw. Cofermentation of pentoses and hexoses by *Escherichia coli*. **Journal of Agricultural Research**, v.13, n. 3, 2015.

LORA, E. E. S.; VENTURINI, O. J. **Biocombustíveis**, Volumes 1 e 2. Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2012.

LU, C.; DONG, J.; YANG, S. T. Butanol Production from wood pulping hydrolysate in an integrated fermentation-gas stripping process. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 467-475, 2013.

MADEIRA JUNIOR, J. V. *et al.* Agro-Industrial Residues and Microbial Enzymes: An Overview on the Eco-Friendly Bioconversion into High Value-Added Products. In: BRAHMACHARI, Goutam; DEMAIN, Arnold L.; ADRIO, José L. (Ed.). **Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. 2017. p. 475-500.

MAITY, S. K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part II. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 1446–1466, 2015.  
MARTIN-SAMPEDRO, J. A. *et al.* Steam explosion treatment of *Eucalyptus globulus* wood: Influence of operational conditions on chemical and structural modifications. **BioResources**, n. 6, v. 4, p. 4922-4935, 2011.

MARTON, J. M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2002.

MENG, X.; RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 150-158, 2014.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresource Technology**, v. 83, p.37-46, 2002.

MCKEOWN, P.; JONES, M. D. The Chemical Recycling of PLA: A Review. **Sustainable Chemistry**, n.1, p. 1–22, 2020.

MILLÁN, G. G. *et al.* Recent Advances in the Catalytic Production of Platform Chemicals from Holocellulosic Biomass. **ChemCatChem**, v. 11, n. 8, p. 2022-2042, 2019.

MIURA, M.; SUZULI, T.; AOYAMA, M. Detoxification of Japanese white birch wood hemicellulose hydrolysate with a carbonaceous sorbent prepared from birch wood hydrolysis residue. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 50, p. 265-268, 2016.

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

MONSCHEIN, M.; NIDETZKY, B. Effect of pretreatment severity in continuous steam explosion on enzymatic conversion of wheat straw: Evidence from kinetic analysis of hydrolysis time courses. **Bioresource Technology**, v.200, p.287–296, 2016.

MONTIPÓ, S. *et al.* Optimisation of Uncatalysed Steam Explosion of Lignocellulosic Biomasses to Obtain Both C6-and C5-Sugars. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1–14, 2018.

MORA-VILLALOBOS, J. A. *et al.* Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. **Fermentation**, v. 6, n. 1, p.1-23, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>. Acesso em 10 Set. 2020.

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

NAMPOOTHIRI, K. M; NAIR, N. R.; JOHN, R. P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8493- 8501, 2010.

NARAYANAN, N.; ROYCHOUDHURY, P. K.; SRIVASTAVA, A. L-(+)-lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 167-178, 2004.

NASCIMENTO, B. F. **Adsorção de furfural em carvão ativado do endocarpo de açaí**. Dissertação de Mestrado, 88 p. Universidade Federal de Pernambuco, Depto. Engenharia Química, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, 2019.

NASIDI, M. *et al.* Improved production of ethanol using bagasse from different sorghum cultivars. **Biomass and Bioenergy**, n. 72, p. 288-299, 2015.

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.

OLIVEIRA, R. A. *et al.* Polymer grade L-lactic acid production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Bacillus coagulans*. **Bioresource Technology Reports**, n. 6, p. 26-31, 2019.

OLSZEWSKA-WIDDRAT, A. *et al.* Batch and continuous lactic acid fermentation based on a multi-substrate approach. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1–14, 2020.

OU, M. S. *et al.* Thermophilic *Bacillus coagulans* requires less cellulases for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to products than

mesophilic microbial biocatalysts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, n. 155, p. 375-385, 2009.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**., v.74, p.25-33, 1999.

PAL, P. *et al.* Process intensification in lactic acid production: A review of membrane-based processes. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**. v. 48, n. 11-12, p. 1549-1559, 2009a.

PAL, S. *et al.* Pilot-scale pretreatments of sugarcane bagasse with steam explosion and mineral acid, organic acid, and mixed acids: synergies, enzymatic hydrolysis efficiencies, and structure-morphology correlations. **Biomass Conversion and Biorefinery**., n. 7, p. 179–189, 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-016-0220-z>. Acesso em: 28 out. 2020.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 17–24, 2000.

PEDERSEN, M.; MEYER, A. S. Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. **New Biotechnology**., v. 27, n. 6, p.739-750, 2010.

PENGILLY, C. **Study of Enzymatic Hydrolysis to Improve Sugar Production from Steam-Pretreated Sweet Sorghum Bagasse and Triticale Straw**. Stellenbosch University, 2013

PEREIRA, S. C. *et al.* 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**., v.8, p.44, 2015.

PINKERT, A.; MARSH, K. N.; PANG, S. Reflections on the solubility of cellulose. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, n.49, v.22, p. 11121–11130, 2010.

PIPPO, W. A. *et al.* Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: current situation and environmental aspects. **Waste and Biomass Valorization**, v.2, p.1–16, 2011.

PITARELO, A.P. *et al.* Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, p. 1502-1509, 2012.

PITARELO, A. P. **Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor**. Tese de Doutorado. Programa de pós-graduação em Química, Área de Química Orgânica, UFPR, 2013.

QIU, Y. *et al.* Recent advances in bio-based multi-products of agricultural Jerusalem artichoke resources. **Biotechnology for Biofuels**. v. 11, n. 151, p. 2-15, jun. 2018.

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

RASAL, R. M.; JANORKAR, A. V.; HIRT, D. E. Poly(lactic acid) modifications. **Progress in Polymer Science**, v.35, n.3, p. 338-356, 2010.

RASMUSSEN, H.; SØRENSEN, H. R.; MEYER, A. S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**, v. 385, p. 45–57, 2014

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 330–340, 2017.

REDDY, G. *et al.* Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 22-34, 2008.

ROCHA, G. J. M. *et al.* Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical–chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015.

ROMERO-GARCÍA, J. M. *et al.* Obtaining sugars and natural antioxidants from olive leaves by steam-explosion. **Food chemistry**, v. 210, p. 457–465, 2016.

ROSILLO-CALLE, F. Alimentos versus combustíveis: podemos evitar o conflito? In: CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P & D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, Cap. 11, p. 101 – 114, 2010.

SANTOS, J. I. *et al.* Evaluation of lignins from side-streams generated in an olive tree pruning-based biorefinery: bioethanol production and alkaline pulping. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 238–251, 2017.

SCHLITTLER, L. A. F. S.; ANTUNES, A. M. S.; PEREIRA JR, N. Use of Patent Applications as a Tool for Technology Development Investigations on Ethanol Production from Lignocellulosic Biomass in Brazil. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 7, p. 80-90, 2012.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, v.2, p. 179-192, 2001.

SHAH, S.S.; AHMAD, I.; AHMAD, W. Adsorptive desulphurization study of liquid fuels using Tin (Sn) impregnated activated charcoal. **Journal of Hazardous Materials**, n. 304, p. 205–213, 2016.

SHEN, J.; AGBLEVOR, F. A. Modeling semi-simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 8, p. 1098–1107, 2010.

SILVA, G. T. *et al.* Sono-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for cellulosic ethanol production. **Catalysis Today**, v. 269, p.21-28, 2016.

SILVA, T. A. L. Effect of Steam Explosion Pretreatment Catalysed by Organic Acid and Alkali on Chemical and Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. **Waste Biomass Valor.**, n. 9, p. 2191–2201, 2018.

SILVEIRA, M. H. L., *et al.* Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries, **ChemSusChem** v.8, p.3366, 2015.

SILVEIRA, M. H. L. *et al.* Production of hemicellulosic sugars from sugarcane bagasse via steam explosion employing industrially feasible conditions: Pilot scale study. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, p. 138-146, 2018.

SINGH, J. K. *et al.* Assessment of different pretreatment technologies for efficient bioconversion of lignocellulose to ethanol. **Frontiers in Bioscience** (Scholar edition), v. 10, p. 350–371, 2018.

SLUITER, A. *et al.* Determination of carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42618. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008b.

SLUITER, A. *et al.* Determination of ash in biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42622. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008c.

SLUITER, A. *et al.* Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42619. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008a.

SLUITER, A. *et al.* Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008d.

STÅHLBERG, T.; SØRENSEN, M. G.; RIISAGER, A. Direct conversion of glucose to 5-(hydroxymethyl)furfural in ionic liquids with lanthanide catalysts. **Green Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 321–325, 2010.

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. Intensification of enzymatic hydrolysis of lignocellulose using ultrasound for efficient bioethanol production: a review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 34, p. 11816–11828, 2013.

SÖDERGÅRD, A.; STOLT, M. Properties of lactic acid-based polymers and their correlation with composition. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 6, p. 1123–1163, 2002.

SUN, J. X. *et al.* Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v.56, p.195-204, 2004.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. **Bioresource Technology**, v.83, p.1-11, 2002.

TABIL, L.; ADAPA, P.; KASHANINEJAD, M. Biomass feedstock pre-processing–part 1: pre-treatment. In: **Biofuel's Engineering Process Technology**. [s.l.], SANTOS B. M. A (Ed.). InTech, Nova Iorque, NY, EUA, 2011.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. **Bioresources**, v. 2, n. 4, p. 707-728, 2007.

TAN, J.; ABDEL-RAHMAN, M.A.; SONOMOTO, K. Biorefinery-Based Lactic Acid Fermentation: Microbial Production of Pure Monomer Product. In: Di Lorenzo M., Androsch R. (eds) Synthesis, Structure and Properties of Poly(lactic acid). **Advances in Polymer Science**, v. 279, p. 27-66, 2017.

TIAN, X. *et al.* L-Lactic acid production benefits from reduction of environmental osmotic stress through neutralizing agent combination. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 9, p. 1917-1923, 2014a.

\_\_\_\_\_. Oxygen transfer efficiency and environmental osmolarity response to neutralizing agents on L-lactic acid production efficiency by *Lactobacillus paracasei*. **Process Biochemistry**, v.49, n.2, p. 2049-2054, 2014b.

TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.160-167, 1997.

THOMSEN, M.H. *et al.* Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.83, p. 447–455, 2009.

TORRES, A. I.; TSAPATIS, M.; DAOUTIDIS, P. Biomass to chemicals: Design of an extractive-reaction process for the production of 5-hydroxymethylfurfural. **Computers & Chemical Engineering**, v. 42, p. 130–137, 2012.

VAN DER POL, E. C. *et al.* Precultivation of *Bacillus coagulans* DSM2314 in the presence of furfural decreases inhibitory effects of lignocellulosic by-products during l(+)-lactic acid fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.1, v.1, p. 1-13, 2016a.

VAN DER POL, E. C. *et al.* Production of L(+)-lactic acid from pretreated sugarcane bagasse using *Bacillus coagulans* DSM2314 in a simultaneous saccharification and fermentation strategy. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 248, p. 1-12, 2016b.

VAN DER POL, E. C. *et al.* Identifying inhibitory effects of lignocellulosic by-products on growth of lactic acid producing micro-organisms using a rapid small-scale screening method. **Bioresource Technology**, n. 209, p. 297–304, 2016c.

VAN MARIS, A. *et al.* Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, n. 90, p. 391-418, 2006.



VARGAZ-GARCIA, M. C. *et al.* In vitro studies on lignocellulose degradation by microbial strains. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 322-328, 2007.

VERT, M. *et al.* Nomenclature and terminology for linear lactic acid-based polymers (IUPAC Recommendations 2019). **Pure and Applied Chemistry**, p. 1-19, 2019. Disponível em: doi:10.1515/pac-2017-1007. Acesso em: 01 nov. 2020.

VICENTINI, R. *et al.* Gene Content Analysis of Sugarcane Public ESTs Reveals Thousands of Missing Coding-Genes and an Unexpected Pool of Grasses Conserved ncRNAs. **Tropical Plant Biology**, v. 5, n. 2, p. 199–205, 2012.

VIEGAS, M. C.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R. Use of tower reactors for continuous ethanol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.2, p.167-173, 2002.

VOHRA, M. *et al.* Bioethanol production: feedstock and current technologies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 573–584, 2014.

WANG, Y; TASHIRO, Y; SONOMOTO, K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. **Journal of Bioscience Bioengineering**, v. 119, n. 1, p. 10-18, 2015.

WEE, Y. J; KIM, J. N; RYU, H. W. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. **Food Technology and Biotechnology**. v.44, n.2, p.163–172, 2006.

WEE, Y. J. *et al.* Batch and repeated batch production of L(+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolyzate and corn steep liquor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 431-435. 2006.

WEE, Y. J; RYU, H. W. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4262-4270, 2009.

WYMAN, C. *et al.* Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. In: **Polysaccharides: Structural, Diversity and Functional Versatility**. 2005.

XUE, C. *et al.* Prospective and development of butanol as an advanced biofuel. **Biotechnology Advances**, n. 31, p. 1575–1584, 2013.

ZABED, H. *et al.* Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751–774, 2016.

ZABED, H. *et al.* Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 475–501, 2017.

ZHANG, F. *et al.* Kinetic characteristics of long-term repeated fed-batch (LtRFb) l-lactic acid fermentation by a *Bacillus coagulans* strain. **Engineering in Life Sciences**, v. 20, n. 12, p. 562–570, 2020.

ZHANG, X.; HEWETSON, B. B.; MOSIER, N. S. Kinetics of Maleic Acid and Aluminum Chloride Catalyzed Dehydration and Degradation of Glucose. **Energy & Fuels**, v. 29, n. 4, p. 2387–2393, 2015a.

ZHANG, Y.; ZHANG, J.; SU, D. 5-Hydroxymethylfurfural: A key intermediate for efficient biomass conversion. **Journal of Energy Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 548–551, 2015b.

ZHANG, W. *et al.* Reducing the heterogeneity of xylan through processing. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p.250-258, 2016.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v.24, p.452-481, 2006.

ZHENG, Y. *et al.* Chapter One - Principles and Development of Lignocellulosic Biomass Pretreatment for Biofuels. **Advances in Bioenergy**, v.2, p. 1-4, 2017.

ZILBERMAN, D. The economics of sustainable development. **American Journal of Agricultural Economics**. v.2, n. 96, p.385–96, 2013.

## APÊNDICE

Resultados da análise por HPLC da hidrólise enzimática dos experimentos do planejamento

**log Ro = 3,67**

Medidas da concentração de Glucose (g/L) nos substratos lavados

7.5 min	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
<b>2</b>	3,03	1,81	3,64	4,17	6,4	9,79	7,59	12,07	8,23
Duplic	3,12	1,64	3,76	4,09	6,82	9,54	7,32	12,25	9,51
<b>4</b>	6,76	4,24	6,45	5,34	14,23	12,76	14,48	19,4	16,68
Duplic	6,54	4,78	6,12	5,69	14,62	12,32	14,69	20,07	15,99
<b>6</b>	9,11	7,14	8,64	6,56	18,59	26,78	22,07	28,71	19,95
Duplic	9,42	7,02	8,91	6,4	17,94	26,09	22,19	29,06	20,22
<b>8</b>	11,24	7,46	9,52	7,43	20,54	28,94	23,81	36,28	25,94
Duplic	11,36	7,72	9,37	7,72	20,07	28,23	23,71	36,84	25,21
<b>10</b>	12,19	9,56	10,82	10,12	21,64	30,46	25,48	40,54	26,64
Duplic	12,32	9,31	11,04	10,01	21,93	30,57	26,03	40,63	26,62
<b>12</b>	13,68	9,98	13,57	11,33	24,89	31,12	28,04	43,51	26,96
Duplic	13,93	10,13	13,88	11,45	25,01	32,03	28,66	43,99	26,85
<b>24</b>	15,82	12,23	15,92	18,52	27,94	35,23	34,52	49,13	37,86
Duplic	15,24	12,66	16,14	18,77	28,13	35,56	34,44	50,17	35,98
<b>48</b>	18,48	15,23	19,44	25,32	32,88	40,07	37,05	57,06	45,24
Duplic	18,17	15,74	19,87	25,16	33,03	40,32	37,43	56,91	43,84
<b>72</b>	20,94	19,65	21,63	28,94	36,06	44,94	39,73	59,16	50,67
Duplic	20,76	19,83	21,96	29,22	36,72	44,72	39,92	58,75	51,12
<b>96</b>	21,09	21,12	22,47	30,09	38,04	46,08	41,04	59,88	52,77
Duplic	21,18	20,94	22,18	29,76	38,41	46,26	41,36	59,42	51,87

7.5 min	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
<b>2</b>	3,075	1,725	3,7	4,13	6,61	9,665	7,455	12,16	8,87
<b>4</b>	6,65	4,51	6,285	5,515	14,425	12,54	14,585	19,735	16,335
<b>6</b>	9,265	7,08	8,775	6,48	18,265	26,435	22,13	28,885	20,085
<b>8</b>	11,3	7,59	9,445	7,575	20,305	28,585	23,76	36,56	25,575
<b>10</b>	12,255	9,435	10,93	10,065	21,785	30,515	25,755	40,585	26,63
<b>12</b>	13,805	10,055	13,725	11,39	24,95	31,575	28,35	43,75	26,905
<b>24</b>	15,53	12,445	16,03	18,645	28,035	35,395	34,48	49,65	36,92
<b>48</b>	18,325	15,485	19,655	25,24	32,955	40,195	37,24	56,985	44,54
<b>72</b>	20,85	19,74	21,795	29,08	36,39	44,83	39,825	58,955	50,895
<b>96</b>	21,135	21,03	22,325	29,925	38,225	46,17	41,2	59,65	52,32

DESVIO									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,06	0,12	0,08	0,06	0,30	0,18	0,19	0,13	0,91
4	0,16	0,38	0,23	0,25	0,28	0,31	0,15	0,47	0,49
6	0,22	0,08	0,19	0,11	0,46	0,49	0,08	0,25	0,19
8	0,08	0,18	0,11	0,21	0,33	0,50	0,07	0,40	0,52
10	0,09	0,18	0,16	0,08	0,21	0,08	0,39	0,06	0,01
12	0,18	0,11	0,22	0,08	0,08	0,64	0,44	0,34	0,08
24	0,41	0,30	0,16	0,18	0,13	0,23	0,06	0,74	1,33
48	0,22	0,36	0,30	0,11	0,11	0,18	0,27	0,11	0,99
72	0,13	0,13	0,23	0,20	0,47	0,16	0,13	0,29	0,32
96	0,06	0,13	0,21	0,23	0,26	0,13	0,23	0,33	0,64

Concentração média de Xilose e Celobiose (g/L) nos substratos lavados

LAVADO									
XILOSE									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,47	0,6	0,492	1,05	0,618	1,18	0,742	1,066	0,992
4	0,6	0,61	0,595	1,11	0,925	1,318	0,955	1,14	1,21
6	0,62	0,745	0,63	1,12	1,02	1,64	1,06	1,68	1,34
8	0,66	0,81	0,64	1,2	1,05	1,68	1,14	1,98	1,44
10	0,72	0,94	0,71	1,22	1,08	1,79	1,16	2,06	1,47
12	0,74	0,98	1,12	1,28	1,2	1,94	1,2	2,1	1,48
24	0,78	1,02	1,28	1,42	1,22	1,98	1,38	2,12	1,48
48	0,78	1,29	1,53	1,448	1,23	1,98	1,44	2,4	1,66
72	0,93	1,46	1,98	1,49	1,38	2,17	1,69	2,56	2,01
96	0,99	1,5	2,04	1,65	1,41	2,59	2,02	3	2,1

LAVADO									
DESVIO									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,11	0,09	0,11	0,07	0,09	0,08	0,09	0,13	0,11
4	0,13	0,08	0,05	0,09	0,12	0,04	0,12	0,01	0,12
6	0,10	0,11	0,08	0,08	0,16	0,17	0,07	0,05	0,08
8	0,15	0,21	0,04	0,11	0,14	0,01	0,22	0,08	0,04
10	0,12	0,10	0,17	0,06	0,15	0,11	0,24	0,03	0,17
12	0,13	0,17	0,23	0,09	0,07	0,11	0,16	0,15	0,13
24	0,11	0,15	0,25	0,12	0,08	0,09	0,13	0,08	0,08
48	0,11	0,07	0,13	0,12	0,11	0,12	0,08	0,04	0,09
72	0,14	0,22	0,12	0,15	0,13	0,06	0,04	0,17	0,12
96	0,10	0,09	0,16	0,12	0,10	0,12	0,17	0,09	0,06

CELOBIOSE									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,12	0,092	0,106	0,38	0,28	0,27	0,304	0,506	0,258
4	0,2	0,13	0,205	0,48	0,38	0,54	0,4	0,54	0,345
6	0,31	0,13	0,16	0,494	0,42	0,59	0,4	0,81	0,34
8	0,31	0,15	0,22	0,505	0,42	0,6	0,45	0,87	0,42
10	0,31	0,21	0,24	0,52	0,43	0,6	0,49	0,92	0,45
12	0,44	0,22	0,26	0,53	0,56	0,74	0,74	0,925	0,46
24	0,44	0,22	0,48	0,56	0,76	1,02	0,96	1,38	1,02
48	0,58	0,27	0,6	0,78	0,9	1,06	1,14	1,88	1,36
72	0,69	0,3	0,66	0,78	1,08	1,47	1,18	2,16	1,71
96	0,69	0,33	0,69	0,96	1,17	1,5	1,29	2,52	1,77

DESVIO	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,12	0,11	0,16	0,11	0,08	0,08	0,16	0,17	0,07
4	0,15	0,13	0,14	0,21	0,04	0,11	0,14	0,01	0,22
6	0,12	0,09	0,15	0,14	0,01	0,22	0,08	0,11	0,24
8	0,15	0,12	0,07	0,15	0,11	0,24	0,03	0,11	0,16
10	0,17	0,16	0,25	0,07	0,11	0,16	0,15	0,09	0,13
12	0,13	0,14	0,11	0,25	0,12	0,08	0,09	0,08	0,15
24	0,08	0,22	0,12	0,13	0,12	0,11	0,24	0,03	0,17
48	0,11	0,24	0,05	0,12	0,15	0,13	0,16	0,15	0,13
72	0,08	0,16	0,08	0,16	0,12	0,10	0,13	0,08	0,08
96	0,11	0,13	0,09	0,17	0,07	0,12	0,08	0,04	0,09

Medidas da concentração de Glucose (g/L) nos substratos centrifugados

7.5 min	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	3,85	3,37	3,78	6,34	7,28	10,74	6,73	10,23	4,91
Duplic	3,13	3,44	3,92	6,12	7,65	10,23	6,31	10,93	5,04
4	5,59	4,55	5,68	7,88	11,86	15,92	11,25	14,55	7,01
Duplic	5,98	4,75	5,89	7,23	11,08	15,28	11,65	14,72	7,34
6	6,59	5,23	6,45	9,51	13,19	18,97	13,13	17,04	8,81
Duplic	6,22	5,44	6,72	9,84	13,54	18,21	13,65	17,45	8,03
8	7,1	5,59	6,95	11,21	14,06	20,85	14,43	19,28	13,44
Duplic	6,92	5,73	7,11	11,03	14,83	19,93	14,9	19,63	12,89
10	7,7	5,87	9,04	11,26	15,28	21,99	16,07	21,99	19,23
Duplic	7,21	6,02	9,54	11,51	15,93	22,21	15,84	21,32	19,67
12	9,6	6,23	10,12	12,36	18,72	26,08	17,21	26,94	23,43
Duplic	9,47	6,76	10,82	12,37	18,22	27,12	17,59	26,44	23,67
24	12,45	9,12	14,25	14,48	27,98	31,32	24,33	38,93	31,97
Duplic	12,62	10,15	14,76	14,76	28,45	31,81	24,76	38,21	31,43
48	15,4	12,86	15,92	21,22	32,64	36,02	28,07	51,42	41,31
Duplic	15,55	13,14	15,57	21,79	32,05	36,59	28,83	51,77	41,76
72	19,02	14,52	18,36	23,06	33,08	43,51	31,77	58,23	44,62
Duplic	19,44	14,84	18,83	23,55	33,43	43,72	31,15	58,89	44,87
96	20,85	15,94	20,46	26,72	36,06	45,39	34,14	59,76	50,89
Duplic	20,46	15,32	20,74	26,17	36,25	45,82	34,57	59,23	50,56

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	3,49	3,405	3,85	6,23	7,465	10,485	6,52	10,58	4,975
4	5,785	4,65	5,785	7,555	11,47	15,6	11,45	14,635	7,175
6	6,405	5,335	6,585	9,675	13,365	18,59	13,39	17,245	8,42
8	7,01	5,66	7,03	11,12	14,445	20,39	14,665	19,455	13,165
10	7,455	5,945	9,29	11,385	15,605	22,1	15,955	21,655	19,45
12	9,535	6,495	10,47	12,365	18,47	26,6	17,4	26,69	23,55
24	12,535	9,635	14,505	14,62	28,215	31,565	24,545	38,57	31,7
48	15,475	13	15,745	21,505	32,345	36,305	28,45	51,595	41,535
72	19,23	14,68	18,595	23,305	33,255	43,615	31,46	58,56	44,745
96	20,655	15,63	20,6	26,445	36,155	45,605	34,355	59,495	50,725

DESVIO									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,51	0,05	0,10	0,16	0,26	0,36	0,30	0,49	0,09
4	0,28	0,14	0,15	0,46	0,55	0,45	0,28	0,12	0,23
6	0,26	0,15	0,19	0,23	0,25	0,54	0,37	0,29	0,55
8	0,13	0,10	0,11	0,13	0,54	0,65	0,33	0,25	0,39
10	0,35	0,11	0,35	0,18	0,46	0,16	0,16	0,47	0,31
12	0,09	0,37	0,49	0,01	0,35	0,74	0,27	0,35	0,17
24	0,12	0,73	0,36	0,20	0,33	0,35	0,30	0,51	0,38
48	0,11	0,20	0,25	0,40	0,42	0,40	0,54	0,25	0,32
72	0,30	0,23	0,33	0,35	0,25	0,15	0,44	0,47	0,18
96	0,28	0,44	0,20	0,39	0,13	0,30	0,30	0,37	0,23

Concentração média de Xilose e Celobiose (g/L) nos substratos centrifugados

CENTRIF									
XILOSE									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	2,01	3,742	2,26	4,265	2,384	4,482	2,308	4,798	3,13
4	2,36	4,09	2,38	4,568	2,82	5,51	3	5,19	3,47
6	2,4	4,1	2,59	4,78	2,87	5,58	3,02	5,39	3,59
8	2,46	4,17	2,62	4,91	2,98	5,68	3,09	5,62	3,62
10	2,49	4,18	2,73	5,15	3,08	5,71	3,1	5,68	3,83
12	2,53	5,3	2,822	5,88	3,18	5,83	3,9	6,1	5,16
24	2,67	5,41	3,02	6,02	3,25	5,94	4,02	6,22	5,19
48	2,84	5,62	3,11	6,11	3,34	6,01	4,13	6,56	5,23
72	2,91	5,83	3,21	6,21	3,54	6,11	4,19	6,77	5,37
96	2,98	5,87	3,29	6,27	3,56	6,24	4,24	6,89	5,41

CENTRIF									
DESVIO									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,15	0,11	0,24	0,03	0,09	0,08	0,22	0,08	0,11
4	0,07	0,11	0,07	0,11	0,16	0,04	0,24	0,03	0,11
6	0,25	0,15	0,25	0,12	0,08	0,17	0,16	0,15	0,09
8	0,15	0,12	0,13	0,12	0,11	0,14	0,21	0,04	0,11
10	0,07	0,15	0,12	0,15	0,13	0,15	0,11	0,16	0,11
12	0,25	0,07	0,16	0,12	0,10	0,11	0,13	0,14	0,21
24	0,11	0,25	0,17	0,07	0,12	0,12	0,09	0,15	0,14
48	0,12	0,13	0,12	0,12	0,11	0,12	0,12	0,07	0,15
72	0,05	0,12	0,15	0,15	0,13	0,15	0,16	0,25	0,07
96	0,08	0,16	0,12	0,12	0,10	0,12	0,14	0,11	0,25

CELOBIOSE									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,182	0,17	0,21	0,18	0,326	0,33	0,306	0,448	0,294
4	0,225	0,24	0,216	0,19	0,47	0,486	0,5	0,59	0,39
6	0,28	0,26	0,27	0,21	0,51	0,66	0,5	0,63	0,51
8	0,3	0,28	0,29	0,29	0,55	0,67	0,6	0,64	0,52
10	0,34	0,47	0,33	0,31	0,58	0,71	0,62	0,75	0,54
12	0,44	0,54	0,42	0,32	0,63	0,75	0,67	0,86	0,565
24	0,48	0,77	0,46	0,34	0,8	0,76	0,72	1,4	1,1
48	0,66	0,82	0,54	0,37	0,9	0,94	0,98	1,89	1,38
72	0,68	0,85	0,56	0,38	1,08	1,1	1,17	2,04	1,59
96	0,75	0,86	0,59	0,41	1,14	1,53	1,17	2,25	1,68

DESVIO	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,08	0,09	0,13	0,08	0,08	0,08	0,16	0,17	0,07
4	0,11	0,12	0,08	0,04	0,09	0,11	0,14	0,01	0,22
6	0,09	0,15	0,14	0,01	0,22	0,08	0,08	0,11	0,24
8	0,12	0,07	0,15	0,11	0,24	0,03	0,03	0,11	0,16
10	0,16	0,25	0,07	0,11	0,16	0,15	0,15	0,09	0,13
12	0,14	0,11	0,25	0,12	0,08	0,03	0,11	0,16	0,15
24	0,07	0,11	0,12	0,13	0,12	0,15	0,09	0,13	0,17
48	0,25	0,12	0,05	0,12	0,15	0,09	0,01	0,22	0,08
72	0,13	0,12	0,08	0,16	0,12	0,24	0,11	0,24	0,03
96	0,12	0,15	0,09	0,17	0,07	0,12	0,11	0,16	0,15

**log Ro = 3,97**

Medidas de Glucose (g/L) nos substratos lavados

15 min	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	2,66	4,25	2,69	6,71	7,27	10,27	6,79	9,07	6,84
Duplic	2,23	4,64	2,13	6,22	7,76	10,54	6,83	9,14	6,72
4	4,67	8,15	4,91	10,96	12,57	18,79	12,49	19,63	15,23
Duplic	4,12	8,99	4,31	10,33	12,81	18,11	12,92	19,01	15,74
6	6,78	11,73	6,88	11,38	17,48	27,06	16,07	28,05	17,63
Duplic	6,21	11,21	6,13	11,13	17,88	27,54	16,67	28,56	17,28
8	7,95	12,81	7,72	16,51	18,82	29,82	17,29	34,03	21,08
Duplic	7,46	12,11	7,29	16,08	19,22	30,04	12,67	34,12	21,75
10	8,54	13,84	8,02	16,69	21,56	36,18	17,34	34,33	21,84
Duplic	8,21	13,94	8,05	16,25	21,28	35,93	18,02	34,92	21,17
12	9,61	14,04	8,27	18,18	21,68	37,04	20,76	42,45	24,49
Duplic	10,23	14,92	8,74	18,87	22,06	38,11	21,03	43,21	24,67
24	13,26	21,36	13,54	26,92	32,54	51,64	31,48	50,09	38,34
Duplic	13,95	22,05	13,97	27,26	32,86	52,08	31,02	51,02	38,85
48	16,52	27,78	18,16	36,24	39,02	61,58	39,32	68,34	48,28
Duplic	16,89	27,21	18,77	36,81	39,52	61,04	39,9	68,73	48,09
72	22,05	27,99	22,17	37,01	44,76	71,43	45,09	81,07	53,22
Duplic	22,78	27,61	22,43	37,81	44,97	71,68	45,56	81,48	53,98
96	23,55	28,74	23,91	39,36	47,61	78,45	48,72	84,75	57,51
Duplic	23,94	28,53	23,82	39,84	47,23	78,06	48,07	84,28	57,78
MÉDIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	2,445	4,445	2,41	6,465	7,515	10,405	6,81	9,105	6,78
4	4,395	8,57	4,61	10,645	12,69	18,45	12,705	19,32	15,485
6	6,495	11,47	6,505	11,255	17,68	27,3	16,37	28,305	17,455
8	7,705	12,46	7,505	16,295	19,02	29,93	14,98	34,075	21,415
10	8,375	13,89	8,035	16,47	21,42	36,055	17,68	34,625	21,505
12	9,92	14,48	8,505	18,525	21,87	37,575	20,895	42,83	24,58
24	13,605	21,705	13,755	27,09	32,7	51,86	31,25	50,555	38,595
48	16,705	27,495	18,465	36,525	39,27	61,31	39,61	68,535	48,185
72	22,415	27,8	22,3	37,41	44,865	71,555	45,325	81,275	53,6
96	<b>23,745</b>	<b>28,635</b>	<b>23,865</b>	<b>39,6</b>	<b>47,42</b>	<b>78,255</b>	<b>48,395</b>	<b>84,515</b>	<b>57,645</b>

DESVIO									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,30	0,28	0,40	0,35	0,35	0,19	0,03	0,05	0,08
4	0,39	0,59	0,42	0,45	0,17	0,48	0,30	0,44	0,36
6	0,40	0,37	0,53	0,18	0,28	0,34	0,42	0,36	0,25
8	0,35	0,49	0,30	0,30	0,28	0,16	3,27	0,06	0,47
10	0,23	0,07	0,02	0,31	0,20	0,18	0,48	0,42	0,47
12	0,44	0,62	0,33	0,49	0,27	0,76	0,19	0,54	0,13
24	0,49	0,49	0,30	0,24	0,23	0,31	0,33	0,66	0,36
48	0,26	0,40	0,43	0,40	0,35	0,38	0,41	0,28	0,13
72	0,52	0,27	0,18	0,57	0,15	0,18	0,33	0,29	0,54
96	0,28	0,15	0,06	0,34	0,27	0,28	0,46	0,33	0,19

Concentração média de Xilose e Celobiose (g/L) nos substratos lavados

LAVADO									
XILOSE									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,108	0,202	0,126	0,306	0,266	0,412	0,28	0,434	0,274
4	0,15	0,3	0,17	0,41	0,34	0,695	0,45	0,78	0,51
6	0,16	0,315	0,17	0,445	0,4	0,76	0,56	1,05	0,51
8	0,16	0,41	0,19	0,56	0,52	0,86	0,58	1,23	0,58
10	0,21	0,44	0,24	0,66	0,55	0,93	0,6	1,25	0,59
12	0,3	0,45	0,29	0,68	0,59	1,18	0,68	1,38	0,68
24	0,3	0,48	0,32	0,78	0,82	1,34	0,7	1,5	0,87
48	0,3	0,48	0,32	0,81	0,84	1,5	0,84	1,82	0,9
72	0,42	0,58	0,36	0,84	0,87	1,74	1,17	2,07	0,96
96	0,45	0,64	0,39	0,9	0,92	1,78	1,35	2,16	1,1

LAVADO									
DESVIO									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,12	0,07	0,15	0,07	0,09	0,15	0,11	0,24	0,03
4	0,16	0,13	0,14	0,21	0,04	0,07	0,11	0,16	0,15
6	0,14	0,09	0,15	0,14	0,01	0,25	0,12	0,08	0,09
8	0,07	0,12	0,07	0,15	0,11	0,13	0,12	0,11	0,24
10	0,25	0,16	0,15	0,14	0,01	0,22	0,08	0,13	0,16
12	0,13	0,22	0,07	0,15	0,11	0,24	0,03	0,11	0,16
24	0,11	0,24	0,25	0,07	0,11	0,16	0,15	0,09	0,08
48	0,11	0,16	0,12	0,10	0,11	0,13	0,11	0,12	0,11
72	0,14	0,08	0,07	0,12	0,12	0,09	0,09	0,15	0,13
96	0,10	0,12	0,05	0,12	0,15	0,09	0,01	0,12	0,10

CELOBIOSE									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,09	0,168	0,106	0,242	0,232	0,304	0,224	0,348	0,208
4	0,145	0,255	0,205	0,405	0,375	0,545	0,36	0,635	0,465
6	0,19	0,32	0,24	0,44	0,46	0,84	0,385	0,85	0,57
8	0,23	0,34	0,26	0,51	0,48	0,9	0,47	0,93	0,65
10	0,25	0,36	0,35	0,56	0,56	1,07	0,48	0,98	0,72
12	0,26	0,36	0,42	0,6	0,84	1,48	0,54	1,6	0,66
24	0,38	0,64	0,48	0,84	0,96	1,66	0,9	2	1,2
48	0,5	0,8	0,6	1,12	1,16	2,1	1,14	2,5	1,56
72	0,72	0,87	0,66	1,23	1,59	2,79	1,53	3,27	1,95
96	0,78	0,99	0,72	1,41	1,74	3,09	1,71	3,4	2,37



DESVIO	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,08	0,09	0,13	0,08	0,11	0,13	0,12	0,11	0,11
4	0,11	0,12	0,08	0,04	0,01	0,05	0,12	0,15	0,11
6	0,03	0,11	0,16	0,15	0,11	0,08	0,16	0,12	0,09
8	0,15	0,09	0,13	0,17	0,02	0,09	0,17	0,07	0,24
10	0,09	0,01	0,22	0,08	0,11	0,13	0,08	0,17	0,16
12	0,24	0,11	0,12	0,07	0,12	0,09	0,11	0,14	0,21
24	0,12	0,15	0,12	0,15	0,12	0,25	0,13	0,15	0,11
48	0,25	0,07	0,16	0,12	0,11	0,11	0,10	0,11	0,13
72	0,13	0,25	0,17	0,07	0,13	0,11	0,12	0,12	0,09
96	0,12	0,13	0,12	0,08	0,10	0,12	0,11	0,06	0,12

Medidas da concentração de Glucose (g/L) nos substratos centrifugados

15 min	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	4,18	6,11	3,87	7,49	10,18	9,83	9,16	10,27	10,09
Duplic	4,06	6,32	3,23	8,06	10,74	9,25	9,62	10,55	10,32
4	4,88	7,06	5,12	10,54	12,94	15,97	11,54	17,83	10,52
Duplic	4,34	7,32	5,43	11,13	12,06	15,67	11,72	17,32	10,81
6	5,11	8,17	6,33	13,94	13,04	17,22	11,96	19,05	12,28
Duplic	5,02	8,05	6,04	13,53	14,59	17,85	12,63	19,45	12,71
8	5,98	8,62	7,01	14,28	15,26	18,35	15,48	21,28	14,87
Duplic	6,27	8,82	7,33	14,04	16,43	18,77	15,7	21,98	15,21
10	7,24	9,05	7,52	14,36	19,34	26,88	16,03	24,76	17,68
Duplic	7,72	9,22	8,23	14,54	21,05	27,12	17,09	25,62	18,66
12	7,68	9,98	10,06	16,22	22,38	33,12	21,04	35,32	21,17
Duplic	8,01	9,52	10,43	17,02	23,11	34,54	21,76	35,67	21,08
24	9,75	10,48	11,66	24,08	27,66	43,12	24,35	51,06	25,76
Duplic	10,22	10,19	11,96	24,45	27,79	44,08	25,17	52,34	25,13
48	11,64	11,88	13,98	26,66	31,02	51,24	30,78	63,44	32,36
Duplic	11,85	11,73	14,54	26,9	31,62	52,33	30,63	63,82	32,19
72	12,68	12,25	15,63	27,78	34,17	61,16	33,63	71,11	35,94
Duplic	12,93	12,8	16,22	27,43	34,76	61,74	34,12	71,23	35,32
96	13,02	13,32	18,12	33,54	35,94	63,62	37,83	75,06	36,36
Duplic	13,23	13,07	18,46	33,19	35,28	63,81	37,65	75,22	36,79
MÉDIA	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	4,12	6,215	3,55	7,775	10,46	9,54	9,39	10,41	10,205
4	4,61	7,19	5,275	10,835	12,5	15,82	11,63	17,575	10,665
6	5,065	8,11	6,185	13,735	13,815	17,535	12,295	19,25	12,495
8	6,125	8,72	7,17	14,16	15,845	18,56	15,59	21,63	15,04
10	7,48	9,135	7,875	14,45	20,195	27	16,56	25,19	18,17
12	7,845	9,75	10,245	16,62	22,745	33,83	21,4	35,495	21,125
24	9,985	10,335	11,81	24,265	27,725	43,6	24,76	51,7	25,445
48	11,745	11,805	14,26	26,78	31,32	51,785	30,705	63,63	32,275
72	12,805	12,525	15,925	27,605	34,465	61,45	33,875	71,17	35,63
96	13,125	13,195	18,29	33,365	35,61	63,715	37,74	75,14	36,575

DESVIO									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,08	0,15	0,45	0,40	0,40	0,41	0,33	0,20	0,16
4	0,38	0,18	0,22	0,42	0,62	0,21	0,13	0,36	0,21
6	0,06	0,08	0,21	0,29	1,10	0,45	0,47	0,28	0,30
8	0,21	0,14	0,23	0,17	0,83	0,30	0,16	0,49	0,24
10	0,34	0,12	0,50	0,13	1,21	0,17	0,75	0,61	0,69
12	0,23	0,33	0,26	0,57	0,52	1,00	0,51	0,25	0,06
24	0,33	0,21	0,21	0,26	0,09	0,68	0,58	0,91	0,45
48	0,15	0,11	0,40	0,17	0,42	0,77	0,11	0,27	0,12
72	0,18	0,39	0,42	0,25	0,42	0,41	0,35	0,08	0,44
96	0,15	0,18	0,24	0,25	0,47	0,13	0,13	0,11	0,30

Concentração média de Xilose e Celobiose (g/L) nos substratos centrifugados

CENTRIF									
XILOSE									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	1	1,814	0,866	1,26	1,274	1,31	1,346	1,18	1,2
4	1,04	1,94	1,09	1,65	1,33	1,79	1,575	1,44	1,2
6	1,052	1,94	1,12	1,7	1,39	1,81	1,58	1,89	1,5
8	1,07	2,01	1,155	2	1,44	1,86	1,7	2,074	1,62
10	1,1	2,02	1,16	2,06	1,58	1,95	1,77	2,325	1,7
12	1,11	2,07	1,16	2,17	1,605	2,03	1,8	2,64	1,78
24	1,14	2,1	1,18	2,38	1,64	2,58	1,88	2,88	1,94
48	1,14	2,12	1,3	2,41	1,71	2,64	2,32	3	2,02
72	1,17	2,285	1,35	2,5	1,84	2,82	2,64	3,08	2,09
96	1,22	2,38	1,44	2,58	1,98	2,88	2,83	3,3	2,11

CENTRIF									
DESVIO									
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	PC
2	0,11	0,12	0,13	0,14	0,10	0,11	0,12	0,11	0,12
4	0,09	0,15	0,12	0,11	0,16	0,12	0,11	0,01	0,14
6	0,08	0,22	0,08	0,13	0,14	0,01	0,25	0,12	0,11
8	0,14	0,24	0,03	0,11	0,08	0,11	0,09	0,17	0,07
10	0,15	0,11	0,24	0,03	0,03	0,01	0,13	0,08	0,17
12	0,07	0,11	0,16	0,15	0,15	0,09	0,09	0,11	0,14
24	0,25	0,12	0,08	0,03	0,11	0,16	0,25	0,13	0,15
48	0,01	0,05	0,12	0,15	0,15	0,14	0,01	0,14	0,01
72	0,11	0,08	0,16	0,12	0,07	0,15	0,11	0,08	0,11
96	0,11	0,09	0,17	0,07	0,25	0,07	0,11	0,02	0,06

<b>CELOBIOSE</b>									
	<b>H1</b>	<b>H2</b>	<b>H3</b>	<b>H4</b>	<b>H5</b>	<b>H6</b>	<b>H7</b>	<b>H8</b>	<b>PC</b>
<b>2</b>	0,148	0,24	0,15	0,292	0,424	0,388	0,51	0,34	0,36
<b>4</b>	0,18	0,25	0,21	0,335	0,53	0,42	0,544	0,455	0,43
<b>6</b>	0,23	0,26	0,27	0,36	0,62	0,585	0,56	0,6	0,438
<b>8</b>	0,25	0,26	0,29	0,53	0,68	0,68	0,56	0,63	0,55
<b>10</b>	0,27	0,29	0,29	0,59	0,69	0,7	0,74	0,72	0,65
<b>12</b>	0,3	0,33	0,4	0,59	0,76	0,78	0,88	0,754	0,72
<b>24</b>	0,42	0,34	0,46	0,72	0,86	0,84	0,92	1,45	0,9
<b>48</b>	0,46	0,38	0,52	0,98	1,02	1,02	0,96	2,08	1,2
<b>72</b>	0,48	0,42	0,54	1,05	1,2	1,22	1,17	2,38	1,29
<b>96</b>	<b>0,48</b>	<b>0,42</b>	<b>0,57</b>	<b>1,23</b>	<b>1,53</b>	<b>1,51</b>	<b>1,25</b>	<b>2,63</b>	<b>1,41</b>

<b>DESVIO</b>	<b>H1</b>	<b>H2</b>	<b>H3</b>	<b>H4</b>	<b>H5</b>	<b>H6</b>	<b>H7</b>	<b>H8</b>	<b>PC</b>
<b>2</b>	0,07	0,11	0,16	0,15	0,12	0,15	0,15	0,04	0,11
<b>4</b>	0,11	0,08	0,16	0,12	0,09	0,11	0,10	0,11	0,09
<b>6</b>	0,14	0,09	0,15	0,14	0,14	0,24	0,03	0,11	0,08
<b>8</b>	0,25	0,12	0,08	0,03	0,15	0,11	0,24	0,24	0,03
<b>10</b>	0,01	0,05	0,12	0,15	0,07	0,09	0,17	0,16	0,15
<b>12</b>	0,13	0,15	0,11	0,14	0,21	0,04	0,08	0,08	0,03
<b>24</b>	0,10	0,13	0,17	0,15	0,14	0,01	0,16	0,15	0,14
<b>48</b>	0,12	0,22	0,08	0,07	0,15	0,11	0,22	0,07	0,15
<b>72</b>	0,11	0,12	0,07	0,15	0,14	0,01	0,24	0,25	0,07
<b>96</b>	0,08	0,12	0,15	0,07	0,15	0,11	0,16	0,12	0,10