

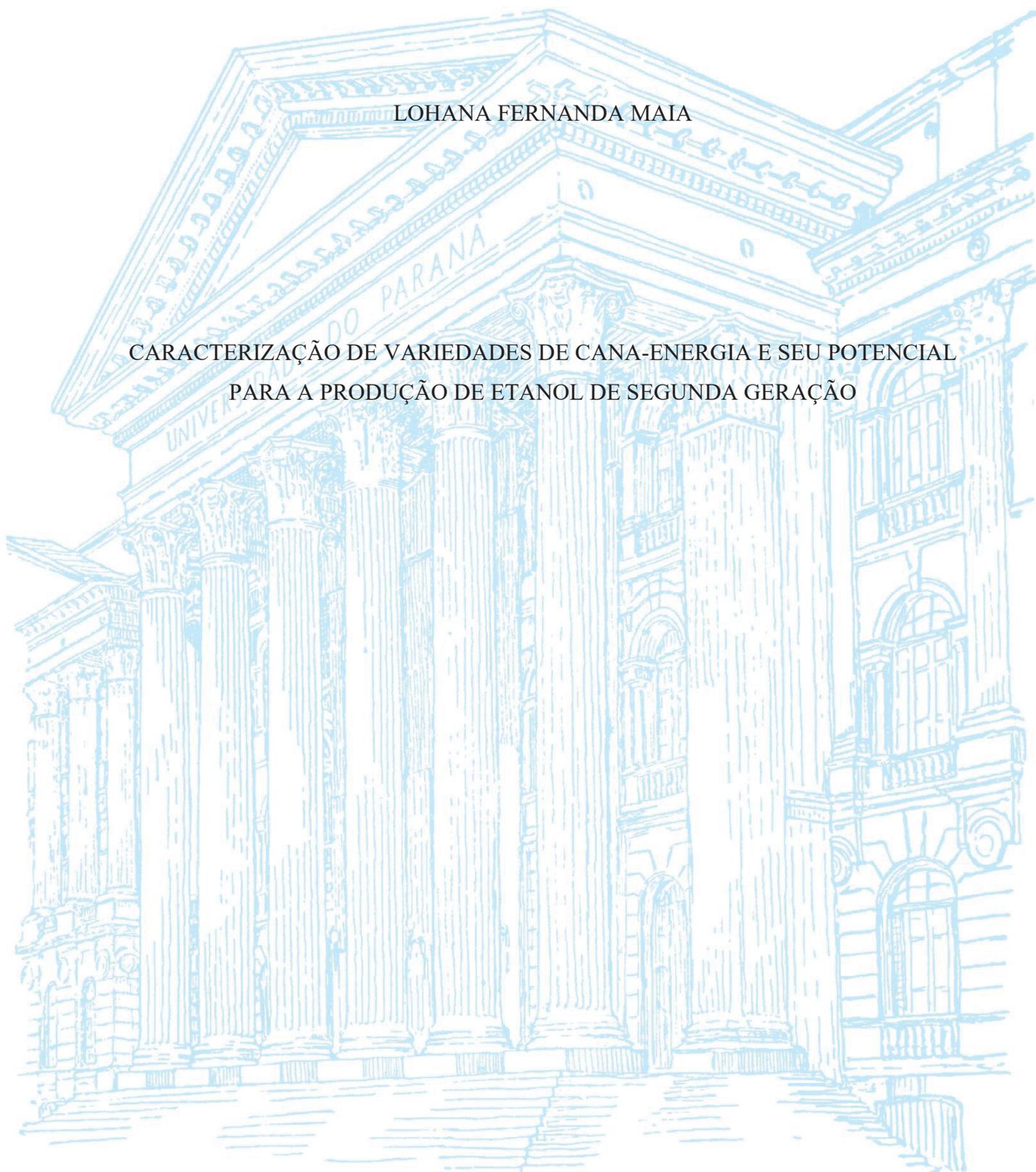
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LOHANA FERNANDA MAIA

CARACTERIZAÇÃO DE VARIEDADES DE CANA-ENERGIA E SEU POTENCIAL  
PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

CURITIBA

2023



LOHANA FERNANDA MAIA

CARACTERIZAÇÃO DE VARIEDADES DE CANA-ENERGIA E SEU POTENCIAL  
PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em  
Engenharia Química – PPGEQ, Setor de Tecnologia,  
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial  
à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Maia, Lohana Fernanda

Caracterização de variedades de cana-energia e seu potencial para a produção de etanol de segunda geração. / Lohana Fernanda Maia .  
– Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos.

1. Biomassa. 2. Lignina - Química. 3. Explosão a vapor. I. Ramos, Luiz Pereira. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM ENGENHARIA QUÍMICA

No dia trinta de maio de dois mil e vinte e tres às 13:30 horas, na sala de Reuniões, Prédio da Engenharia Química no Centro Politécnico da UFPR, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **LOHANA FERNANDA MAIA**, intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DE VARIEDADES DE CANA-ENERGIA E SEU POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ PEREIRA RAMOS. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: LUIZ PEREIRA RAMOS (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), JULIO CEZAR ARAUJO DO ESPIRITO SANTO (BIOFLEX AGROINDUSTRIAL S.A.). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, LUIZ PEREIRA RAMOS, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 30 de Maio de 2023.

Assinatura Eletrônica

31/05/2023 07:50:16.0

LUIZ PEREIRA RAMOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/06/2023 11:41:51.0

FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/05/2023 17:16:20.0

JULIO CEZAR ARAUJO DO ESPIRITO SANTO

Avaliador Externo (BIOFLEX AGROINDUSTRIAL S.A.)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA QUÍMICA  
- 40001016056P9

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LOHANA FERNANDA MAIA** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DE VARIEDADES DE CANA-ENERGIA E SEU POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ PEREIRA RAMOS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 30 de Maio de 2023.

Assinatura Eletrônica

31/05/2023 07:50:16.0

LUIZ PEREIRA RAMOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/06/2023 11:41:51.0

FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/05/2023 17:16:20.0

JULIO CEZAR ARAUJO DO ESPIRITO SANTO

Avaliador Externo (BIOFLEX AGROINDUSTRIAL S.A.)

---

Rua Cel. Francisco Heráclito dos Santos, s/nº - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-3590 - E-mail: ppgeq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 288253

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 288253

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me proporcionar força, sabedoria e proteção para vencer mais esta etapa.

Aos meus pais, Sandra e Marcelo, pelo amor, carinho, ensinamentos e o apoio durante a realização do mestrado, e por fazerem de mim a pessoa que sou hoje. Agradeço aos meus irmãos pelo companheirismo e incentivo constante ao me motivar nos momentos mais difíceis.

Em especial ao meu namorado João Antonio, por todo o amor, carinho, incentivo e, principalmente, paciência durante esses dois anos. Você sempre foi um apoio para que eu pudesse prosseguir.

Agradeço ao meu orientador Dr. Luiz Pereira Ramos, que se dedicou de forma ímpar nesse projeto, contribuindo de forma dedicada à minha formação acadêmica.

Ao coorientador Dr. Thiago Alexandre Silva por toda a dedicação, paciência e amizade. Obrigada pelo tempo dedicado e por todo o conhecimento compartilhado.

Agradeço a todos os docentes do Curso de Pós-Graduação da Universidade Federal do Paraná, em especial ao Dr. Arion Zandoná Filho por colaborar nesse projeto.

Um agradecimento especial as minhas amigas Ana Carolina e Bruna por estarem presentes tornando o nosso local de trabalho um ambiente mais agradável e pela contribuição direta na realização desse trabalho.

A CNPq e GranBio, pelo apoio financeiro e bolsa de estudo.

Finalmente, a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto, os meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A produção de etanol celulósico a partir de biomassa lignocelulósica, como resíduos agrícolas e agroindustriais, têm se demonstrado um tema cada vez mais estratégico para a indústria sucroalcooleira. Nesse sentido, a cana-energia surgiu como uma alternativa promissora para aumentar a produtividade de biomassa no campo e gerar plantas com maior teor de fibras sem que a produção de sacarose seja comprometida. Esse trabalho teve por objetivo estudar o potencial da cana-energia para o desenvolvimento de uma biorrefinaria baseada na produção de etanol de segunda geração. Para isso, cinco amostras de bagaço de cana-energia (Vertex 2, 3, 7, 9 e 11) e uma da cana-de-açúcar de referência (RB92579) foram submetidas às etapas de caracterização, pré-tratamento por explosão a vapor, hidrólise enzimática e fermentação dos hidrolisados a etanol. Todos os bagaços foram inicialmente lavados com água em um teor de sólidos de 5% ( $m \cdot v^{-1}$ ) a 50 °C por 1 h para remover a sacarose residual. A seguir, as amostras foram caracterizadas de acordo com procedimentos analíticos padronizados para a análise de gramíneas e os resultados indicaram não haver diferença significativas em sua análise composicional. Os ensaios de explosão a vapor foram realizados a 195°C por 7,5 min em condições de auto-hidrólise (ausência de catalisador exógeno). As frações sólidas e líquidas derivadas do pré-tratamento foram caracterizadas de modo a avaliar o seu efeito sobre a composição química dos bagaços e determinar os rendimentos mássicos do processo (base seca). A maior recuperação mássica obtida foi de 88,6% para a amostra RB92579, enquanto a menor foi de 78,1% para a amostra Vertex 7. Já em relação à recuperação da fração sólida fibrosa, a amostra Vertex 11 forneceu o maior rendimento de 68,4%. A explosão a vapor promoveu a remoção seletiva das hemiceluloses, que foram parcialmente recuperadas na fração líquida ou licor de pré-tratamento. A análise cromatográfica desta fração demonstrou a presença de xilo-oligossacarídeos, cuja concentração foi menor nos licores de pré-tratamento das amostras Vertex 2, Vertex 11 e RB92579, sugerindo, portanto, uma maior propensão à hidrólise ácida. Os substratos pré-tratados foram lavados com água a 5% de sólidos para separação do licor de pré-tratamento, também denominado hidrolisado hemicelulósico ou fração C5. Posteriormente, ensaios de acessibilidade enzimática foram realizados em frasco agitado com a enzima Cellic CTec3 (Novozymes) empregando 2 e 15% de sólidos e carga enzimática de 30 e 60  $mg \cdot g^{-1}$  de material seco, respectivamente. Os melhores rendimentos em equivalentes de glucose após 96 h de hidrólise foram de 89,4%, 85,5% e 86,5% a 15% de sólidos para as amostras Vertex 3, Vertex 7 e Vertex 11, respectivamente. O aumento da escala de hidrólise enzimática foi testado em biorreator a 15% de sólidos e carga enzimática de 60  $mg \cdot g^{-1}$  de material seco. O hidrolisado enzimático com maior concentração de glucose das amostras de cana-energia (Vertex 11) e o da amostra controle (RB92579) foram fermentados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT1. Os ensaios de fermentação foram conduzidos em biorreator por 24 h a 30°C. Os títulos de etanol obtidos para as amostras foram de 33,7 e 27,4  $g \cdot L^{-1}$  para os hidrolisados Vertex 11 e RB92579, com rendimentos de etanol de 83,0% e 86,5%, respectivamente. Das cinco variedades envolvidas nesse estudo, a Vertex 11 foi a que apresentou o melhor desempenho, revelando um potencial de produção de 7.293  $L \cdot ha^{-1}$  de etanol celulósico em comparação com 2.230  $L \cdot ha^{-1}$  do material de referência. Além disso, a lignina contida no material pré-tratado mostrou-se amplamente solúvel em etanol (93,5%), abrindo com isso uma grande oportunidade para aplicações em biorrefinaria.

**Palavras-chave:** explosão a vapor; biomassa lignocelulósica; caracterização química

## ABSTRACT

The production of cellulosic ethanol from lignocellulosic biomass, such as agricultural and agroindustrial residues, has become an increasingly strategic topic for the sugar and alcohol industry. In that regard, energy cane emerged as a promising alternative to increase biomass productivity in the field and generate plants with higher fiber content without compromising sucrose production. This work aimed to study the potential of energy cane for the development of a biorefinery based on the production of second-generation ethanol. Thereunto five samples of energy cane bagasse (Vertex 2, 3, 7, 9 and 11) and one sample of sugarcane reference (RB92579) were tested in the characterization steps, pre-treatment by steam explosion, enzymatic hydrolysis and fermenting the hydrolysates to ethanol. All bagasse were initially washed with water at a solids content of 5% ( $m \cdot v^{-1}$ ) at 50 °C for 1 h to remove residual sucrose. Hereafter, the samples were characterized according to standardized analytical procedures for the analysis of grasses and the results indicated that there were no significant differences in their compositional analysis. The steam explosion tests were carried out at 195°C for 7,5 min under autohydrolysis conditions (absence of exogenous catalyst). The solid and liquid fractions derived from the pre-treatment were characterized in order to evaluate their effect on the chemical composition of the bagasse and determine the mass yields of the process (dry basis). The highest mass recovery obtained was 88,6% for the RB92579 sample, while the lowest was 78,1% for the Vertex 7 sample. Regarding the recovery of the fibrous solid fraction, the Vertex 11 sample provided the highest yield of 68,4%. The steam explosion promoted the selective removal of hemicelluloses, which were partially recovered in the liquid fraction or pre-treatment liquor. The chromatographic analysis of this fraction set forth the presence of xylo-oligosaccharides, whose concentration was lower in the pre-treatment liquors of the Vertex 2, Vertex 11 and RB92579 samples, therefore suggesting a greater propensity for acid hydrolysis. The pre-treated substrates were washed with water at 5% solids to separate the pre-treatment liquor, also called hemicellulosic hydrolyzate or C5 fraction. Subsequently, enzymatic accessibility tests were carried out in a shaken flask with the enzyme Cellic CTec3 (Novozymes) using 2 and 15% of solids and enzymatic load of 30 and 60  $mg \cdot g^{-1}$  of dry material, respectively. The best yields in glucose equivalents after 96 h of hydrolysis were 89,4%, 85,5% and 86,5% to 15% solids for the Vertex 3, Vertex 7 and Vertex 11 samples, respectively. The increase in scale of enzymatic hydrolysis was tested in a bioreactor at 15% solids and enzymatic load of 60  $mg \cdot g^{-1}$  of dry material. The enzymatic hydrolyzate with the highest concentration of glucose from the energy cane samples (Vertex 11) and the control sample (RB92579) were fermented with the *Saccharomyces cerevisiae* yeast CAT1. The fermentation tests were conducted in a bioreactor for 24 h at 30°C. The ethanol titles obtained for the samples were 33,7 and 27,4  $g \cdot L^{-1}$  for Vertex 11 and RB92579 hydrolysates, with ethanol yields of 83,0% and 86,5%, respectively. Among the five varieties involved in this study, Vertex 11 was the one with the best performance, revealing a production potential of 7.293  $L \cdot ha^{-1}$  of cellulosic ethanol compared to 2.230  $L \cdot ha^{-1}$  of the reference material. Furthermore, the lignin contained in the pre-treated material was widely soluble in ethanol (93,5%), thus opening up a great opportunity for biorefinery applications.

**Key-words:** steam explosion; lignocellulosic biomass; chemical characterization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diferenças físicas entre os cultivares (a) cana-energia (b) cana-de-açúcar .....	23
Figura 2- Produtividade potencial da cana-energia comparada a cana-de-açúcar em nove ciclos de colheita .....	24
Figura 3- Cadeia linear da celulose, evidenciando a celobiose como sua unidade conformacional básica, os terminais não redutor (TNR) e redutor (TR), com a hidroxila anomérica em orientação equatorial .....	25
Figura 4- Ligações de hidrogênio intra e intermoleculares entre as cadeias de celulose .....	26
Figura 5- Representação das fórmulas estruturais das unidades monoméricas mais comumente encontradas nas hemiceluloses: (A1) D-xilose, (A2) L-arabinose, (B1) D-glucose, (B2) D-galactose, (C1) ácido-D-glucurônico e (C2) ácido 4-O-metil-D-glucurônico .....	27
Figura 6- Representação de uma cadeia de 4-O-metil-glucuronoarabinoxilana presente tipicamente na parede celular de gramíneas .....	28
Figura 7- Monômeros formadores da estrutura da lignina .....	29
Figura 8 - Esquema da estrutura de um fragmento de lignina e de suas principais ligações ...	30
Figura 9- A unidade típica de explosão de vapor em batelada.....	33
Figura 10- Reator de explosão a vapor modelo contínuo.....	34
Figura 11- Modo de ação catalítica de celulasas durante hidrólise da celulose .....	36
Figura 12- (a) Desenho de um biorreator de tanque agitado equipado com dois impulsores (b) misturador Peg (c) impulsor de âncora (d) impulsor de fita helicoidal (e) turbina de Rushton (f) impulsor orelha de elefante.....	40
Figura 13- Configurações disponíveis para o processamento da biomassa lignocelulósica ....	42
Figura 14- Principais etapas do projeto proposto para a obtenção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana-energia (A) Preparo da amostra e caracterização química da biomassa (B) Pré-tratamento da biomassa (C) Hidrólise enzimática dos materiais tratados .....	51
Figura 15- Instalações do reator de explosão a vapor no NPDEAS (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável) da Universidade Federal do Paraná .....	56
Figura 16- Componentes monitorados por cromatografia a líquido na fração solúvel obtida após pré-tratamento a vapor, empregando os detetores (A) de índice de refração e (B) de absorção no ultravioleta.....	57
Figura 17- (A) Biorreator de bancada utilizado nos ensaios de hidrólise (B) Biorreator utilizado para os ensaios de fermentação .....	61

Figura 18 - Teor de sacarose obtido nas amostras após lavagem aquosa.....	63
Figura 19- Teste de Tukey para os teores médios de lignina insolúvel das amostras .....	66
Figura 20- Recuperação mássica das amostras após pré-tratamento por explosão a vapor realizado a 195°C e 7,5 min .....	67
Figura 21- Teste de Tukey para a recuperação da fração sólida fibrosa gerada a partir da explosão a vapor de cana-energia e de cana-de-açúcar .....	68
Figura 22- Teste de Tukey para a recuperação da fração líquida gerada a partir da explosão a vapor de cana-energia e de cana-de-açúcar .....	69
Figura 23- Perfil cromatográfico das frações solúveis em água obtidas após pré-tratamento por explosão a vapor de amostras de cana energia e do material de referência (RB): (A) carboidratos e ácidos orgânicos; (B) compostos furânicos .....	70
Figura 24- Oligossacarídeos formados a partir da hidrólise das hemiceluloses durante pré-tratamento a vapor .....	71
Figura 25- Normalização de área dos cromatogramas obtidos para a análise dos oligossacarídeos derivados das hemiceluloses por explosão a vapor.....	72
Figura 26- Perfil cromatográfico após análise por HPLC das frações solúveis obtidas após o pré-tratamento (auto-hidrólise), após procedimento de pós-hidrólise.....	73
Figura 27- Recuperação de (A) glucanas e (B) xilanas nas frações sólida e líquida para a explosão a vapor a 195°C por 7,5 min dos bagaços de cana-energia e cana-de-açúcar.....	74
Figura 28- Perfil de hidrólise enzimática dos materiais explodidos a vapor em relação ao rendimento de equivalentes de glucose para experimentos realizados a 2% de sólidos totais com 30 mg g <sup>-1</sup> de Cellic CTec3: (A) RB92579, (B) Vertex 2, (C) Vertex 3, (D) Vertex 7, (E) Vertex 9 e (F) Vertex 11 .....	76
Figura 29- Perfil de hidrólise enzimática dos materiais explodidos a vapor em relação ao rendimento de equivalentes de glucose para experimentos realizados a 15% de sólidos totais com 60 mg g <sup>-1</sup> de Cellic CTec3: (A) RB92579, (B) Vertex 2, (C) Vertex 3, (D) Vertex 7, (E) Vertex 9 e (F) Vertex 11 .....	78
Figura 30- Perfil de hidrólise dos materiais explodidos a vapor em relação à concentração (g L <sup>-1</sup> ) de glucose para experimentos realizados a 15% de sólidos totais com 60 mg g <sup>-1</sup> de Cellic CTec3: (A) RB92579, (B) Vertex 2, (C) Vertex 3, (D) Vertex 7, (E) Vertex 9 e (F) Vertex 11 .....	79
Figura 31- Produção de etanol celulósico a partir do pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática das amostras (A) Vertex 11 e (B) RB92579 .....	85
Figura 32- Comparação dos espectros obtidos na região do infravermelho das ligninas extraídas em etanol .....	89

Figura 33 - Correlação matricial dos espectros de lignina extraída das variedades de cana (A) e correlação de componentes principais (B).....90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação entre a cana-de-açúcar e a cana-energia.....	22
Tabela 2- Principais técnicas de pré-tratamentos para a biomassa lignocelulósica .....	31
Tabela 3- Estudos sobre etanol de segunda geração.....	46
Tabela 4- Dados de produtividade das variedades de cana-energia em comparação a cana-de-açúcar de referência sob mesmas condições experimentais .....	50
Tabela 5- Composição química dos bagaços de cana-energia e cana-de-açúcar .....	64
Tabela 6- Composição química da fração sólida após pré-tratamento a vapor .....	69
Tabela 7- Recuperação mássica dos componentes presentes nas frações sólida e líquida após pré-tratamento a vapor.....	74
Tabela 8- Comparação dos rendimentos de glucose obtidos após 72 h de hidrólise enzimática a 15% de sólidos totais em biorreator de bancada e frascos Enlarmeyer .....	81
Tabela 9- Rendimento de etanol de hidrolisados enzimáticos e solução padrão de glucose....	83
Tabela 10- Percentual de lignina extraída e rendimento mássico da extração .....	88

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

2G	Segunda Geração
<i>A</i>	Absorbância
AFEX	Explosão a vapor com amônia líquida
AnAra	Anidroarabinose
AnGlc	Anidrogucose
AnXyl	Anidroxilose
ART	Teor de açúcares total na cana por tonelada de biomassa <i>in natura</i>
<i>C</i>	Cinzas
C5	Fração de pentoses
C6	Fração de hexoses
CBH	Celobiohidrolase
CBM	Módulo de ligação aos carboidratos
CBP	Bioprocessamento consolidado
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
COP21	Conferência das Nações Unidas
<i>CP</i>	Passo ótico
<i>D</i>	Diluição
<i>E</i>	Teor de extrativos
E1G	Etanol de Primeira Geração
E2G	Etanol de Segunda Geração
<i>E<sub>f</sub></i>	Rendimento de fermentação
EG	Endoglucanase
$\epsilon$	Absortividade molar
FPU	Unidades de filtro de papel
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
G	Unidades guaiacila da estrutura de ligninas
°GL	Grau Gay-Lussac
Glc	Glucose
<i>EqGlc</i>	Equivalente de glucose
GP	Grau de polimerização
H	Unidades p-hidroxifenila da estrutura de ligninas
HMF	Hidroximetilfurfural

HPLC	Cromatografia a líquido de alta eficiência
IEA	Agência Internacional de Energia
$L_E$	Rendimento mássico da lignina solúvel em etanol
LIA	Lignina insolúvel em ácido
LPMOs	Monooxigenases líticas de polissacarídeos
LSA	Lignina solúvel em ácido
NPDEAS	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável
NREL	Laboratório Nacional de Energias Renováveis
RenovaBio	Política Nacional de Biocombustíveis
$R_m$	Rendimento mássico da fração sólida recuperada da explosão a vapor
$S_o$	Fator de severidade da explosão a vapor
S	Unidades siringila da estrutura de ligninas
SHCF	Hidrólise Enzimática Separada e Cofermentação
SHF	Hidrólise Enzimática Separada da Fermentação
SPORL	Pré-tratamento com sulfito para superar a recalcitrância da lignocelulose
SSCF	Sacarificação e Cofermentação Simultâneas
SSF	Sacarificação e Fermentação Simultâneas
TAH	Toneladas de Açúcar por hectare
TFH	Toneladas de Fibra por hectare
TMSH	Toneladas de biomassa seca por hectare
TMVH	Toneladas de biomassa <i>in natura</i> por hectare
$TU$	Teor de umidade
$V$	Volume
XOs	Xilo-oligossacarídeos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>21</b>
3.1 CANA-DE-AÇÚCAR E CANA-ENERGIA.....	21
3.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....	23
3.3 CELULOSE.....	24
3.4 HEMICELULOSES .....	26
3.5 LIGNINA .....	28
3.6 PRÉ-TRATAMENTO .....	29
3.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	35
3.8 PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	41
3.9 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS .....	43
3.10 ESTUDOS SOBRE ETANOL LIGNOCELULÓSICO .....	44
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
4.1 PRINCIPAIS ETAPAS DO TRABALHO.....	49
4.2 MATERIAL .....	49
4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA.....	52
4.3.1 Lavagem do material .....	52
4.3.1 Determinação de umidade .....	52
4.3.2 Determinação de cinzas .....	53
4.3.3 Determinação dos extrativos .....	53
4.3.4 Determinação de carboidratos e lignina .....	54
4.4 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....	55
4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS.....	57
4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	58
4.6.1 Hidrólise enzimática em biorreator .....	59
4.7 FERMENTAÇÃO .....	59
4.7.1 Preparação do meio de cultura.....	59
4.7.2 Ensaios de fermentação em biorreator.....	60

4.8 EXTRAÇÃO DA LIGNINA .....	61
4.8.1 Análise da lignina extraída .....	62
4.9 TESTE DE TUKEY .....	62
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
5.1 LAVAGEM DAS AMOSTRAS .....	63
5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA .....	64
5.3 EXPLOSÃO A VAPOR.....	67
5.3.1 Composição química das frações sólida e líquida após a explosão a vapor.....	69
5.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	75
5.4.1 Aumento de escala da hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados .....	80
5.5 FERMENTAÇÃO .....	82
<b>6 BALANÇO DE MASSAS .....</b>	<b>85</b>
<b>7 EXTRAÇÃO DA LIGNINA .....</b>	<b>88</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO I- TESTE TUKEY REALIZADO PARA OS COMPONENTES DA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA APÓS LAVAGEM .....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Diante das perspectivas que regem o desenvolvimento econômico global, uma das principais preocupações é a geração de energia suficiente para suprir a demanda atual, partindo de uma premissa sustentável (MEHARIYA *et al.*, 2018; PARTHIBA KARTHIKEYAN *et al.*, 2018). Os combustíveis de origem fóssil, como carvão, petróleo bruto e gás natural, têm sido responsáveis por 85% do abastecimento da energia global. Sua utilização intensiva provoca graves impactos ambientais, como o aquecimento global e suas consequências como a ocorrência de desastres ambientais e a perda de biodiversidade, devido às alterações climáticas decorrentes de altas taxas de emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera (ZHANG *et al.*, 2018; ZHONG *et al.*, 2020).

As políticas e as tendências econômicas atuais estão pautadas na geração de energia a partir de fontes renováveis. De acordo com a *International Energy Agency* (IEA, 2021), o crescimento do uso de combustíveis provindos de fontes renováveis foi de 8% em 2021 e a expectativa é de que haja um acréscimo de até 6% em 2023. No ano de 2015, durante a 21ª Conferência das Nações Unidas (COP 21 em Paris), foi estabelecido um acordo entre os países membros para reduzir a taxa de aquecimento global. Com isso, o Brasil assumiu um compromisso voluntário para restringir suas emissões de gases de efeito estufa em 43% e atingir a participação de 45% de energias renováveis em sua matriz energética, com definição de metas a serem alcançadas até 2028 (GRANGEIA *et al.*, 2022).

Uma das alternativas para atender os objetivos propostos foi a aprovação da Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) em 2017, visando ampliar a produção de biocombustíveis no país por meio de ativos financeiros como créditos de carbono e critérios de descarbonização do setor energético, sendo estes uma função direta do monitoramento e controle da emissão de gases de efeito estufa (GRANGEIA *et al.*, 2022). A premissa é que, até 2027, haja uma redução em 4% do consumo de fontes não renováveis para a geração de energia e, simultaneamente, um aumento de 4% da participação de fontes renováveis na matriz energética nacional (GRANGEIA *et al.*, 2022). Dessa forma, é fundamental o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a geração de energia a partir de fontes renováveis, empregando recursos que já estejam disponíveis e evitando a necessidade de ampliar a produção mediante premissas que levem à degradação ambiental.

Diante deste cenário, diversos estudos já foram desenvolvidos para aumentar a produção de combustíveis a partir de fontes renováveis (MATSUOKA *et al.*, 2014). Dentre as diversas matérias-primas investigadas até então, a biomassa lignocelulósica é a mais abundante no

planeta. Esta matéria-prima apresenta grande potencial para a produção de biocombustíveis como alternativa para substituir parcialmente a demanda global por combustíveis fósseis. Uma das suas principais vantagens é a capacidade de minimizar as emissões de carbono como também capturar o que já foi emitido, através da fixação de CO<sub>2</sub> pela fotossíntese (ZHANG *et al.*, 2018; ZHONG *et al.*, 2020; GRASSI e PEREIRA, 2019).

Um dos setores de grande importância para esta iniciativa é o sucroalcooleiro, uma vez que possibilita a substituição parcial de combustíveis fósseis pelo etanol de primeira geração (E1G) e a produção de bioenergia e/ou bioeletricidade pelo uso energético de resíduos oriundos de seu processamento. Além disso, ainda se faz possível produzir o etanol de segunda geração (E2G) a partir de resíduos lignocelulósicos, como bagaço e palha de cana-de-açúcar (BARBOSA *et al.*, 2020).

A rota tecnológica baseada no processamento de biomassa não alimentícia para a extração de carboidratos e lignina é conhecida como de segunda geração (2G). A principal característica das tecnologias 2G é que os carboidratos presentes na matéria-prima não estão presentes de uma forma acessível, mas como polissacarídeos estruturais como celulose e hemiceluloses. O processo de transformação desses polissacarídeos em açúcares fermentescíveis é realizado mediante um processo de pré-tratamento seguido de hidrólise, normalmente enzimática, que converte a cadeia polimérica em monômeros. A partir dessa etapa, é possível produzir E2G por meio de um processo de fermentação (BONATTO *et al.*, 2020).

Com o avanço da tecnologia de conversão de celulose em etanol e a possibilidade da utilização de resíduos agrícolas e agroindustriais para a cogeração de energia elétrica, o aumento da produção de biomassa lignocelulósica tem se convertido em tema cada vez mais estratégico para a indústria (BOSCHIERO *et al.*, 2019). Nesse sentido, a cana-energia surgiu como estratégia para aumentar a produção no campo e gerar plantas com maior teor de fibra. A cana-energia é uma variedade de cana-de-açúcar derivada de espécies silvestres com híbridos comerciais. Suas principais características são alto teor de fibras, perfilhamento e produção de biomassa, sendo ideal para a produção de biocombustíveis e energia térmica por ser uma variante capaz de produzir pelo menos duas vezes mais biomassa por unidade de área do que a cana-de-açúcar tradicional (CECCATO-ANTONINI *et al.*, 2017; MATSUOKA e RUBIO, 2019).

De acordo com Matsuoka e Rubio (2019), ao substituir a cana-de-açúcar por cana-energia na atual área de terras utilizadas no Brasil para produção de etanol, pode-se atingir a meta de 50 bilhões de litros em 2030, meta prevista para cumprir o compromisso firmado na

COP21, sem a exigência de qualquer terreno adicional. No entanto, essa meta depende da inserção de maneira significativa do E2G na matriz energética nacional a partir de 2023, de modo a atingir pelo menos 2,5 bilhões de litros por ano. Além disso, além de uma excelente cultura energética, a cana-energia também apresenta grande potencial para a obtenção de outros produtos além do etanol. Porém, para sua aplicação adequada nos diversos seguimentos de uma biorrefinaria, faz-se necessário o conhecimento pleno de sua composição química e da reatividade de seus componentes macromoleculares. Essa pesquisa visa demonstrar o potencial da cana-energia para a produção de E2G a partir do bagaço. Para isto, cinco variedades de cana-energia foram investigadas e comparadas ao material genético de origem (cana-de-açúcar convencional), visando caracterizar a susceptibilidade dessas matérias-primas às etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação alcoólica.

## 2 OBJETIVOS

Nesta seção encontram-se apresentados os objetivos gerais e específicos deste trabalho.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Demonstrar o potencial de cinco variedades de cana energia para a produção de etanol celulósico, mediante as etapas de pré-tratamento por explosão a vapor, hidrólise enzimática e fermentação, e comparar o seu desempenho com o apresentado pelo seu material genético de origem.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a composição química dos principais componentes presentes nos bagaços de cinco variedades de cana-energia e do seu material genético de origem;
- Realizar o pré-tratamento por explosão a vapor das variedades de cana-energia e determinar a recuperação mássica das frações sólidas e líquidas pré-tratadas, comparativamente ao seu material genético de origem;
- Caracterizar quimicamente as frações sólidas e líquidas derivadas do pré-tratamento a vapor de todas as matérias-primas envolvidas nesse estudo;
- Avaliar a susceptibilidade dos substratos pré-tratados à hidrólise enzimática a partir do uso de complexos celulásicos comerciais;
- Fermentar os hidrolisados produzidos por hidrólise enzimática de substratos celulósicos pré-tratados por explosão a vapor;
- Analisar a produtividade de etanol celulósico a partir da cana-energia e caracterizar o seu desempenho em comparação ao seu material genético de origem.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção encontra-se uma revisão da literatura sobre o embasamento teórico envolvendo a produção de etanol de segunda geração, assim como um resumo de alguns estudos realizados com condições e/ou objetivos semelhantes ao deste trabalho.

#### 3.1 CANA-DE-AÇÚCAR E CANA-ENERGIA

A cana-de-açúcar (gênero *Saccharum*) é uma das principais culturas agrícolas produzidas em países tropicais e subtropicais (DINIZ *et al.*, 2019). O maior produtor de cana-de-açúcar no mundo é o Brasil, com uma área plantada prevista para safra 2022/23 em 8.307,3 mil hectares e produtividade média estimada em 72 t·ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2022). Em virtude desta alta produtividade, a cana-de-açúcar é a principal matéria-prima para obtenção de açúcar (sacarose), etanol e bioenergia no país (DINIZ *et al.*, 2019)

Por muito tempo, a cana-de-açúcar sofreu diversos melhoramentos genéticos para se aumentar a produção e a produtividade de sacarose, dado o aumento da demanda por produtos dela derivados como açúcar e E1G (MATSUOKA *et al.*, 2012). Devido ao ganho do teor de sacarose, a planta tornou-se cada vez menos rústica, impondo limites agrônômicos. Porém, com o amadurecimento da abordagem de biorrefinarias, os processos de conversão que incentivam o uso do carbono vegetal para a geração de diversos coprodutos impulsionaram o surgimento de projetos que visam ao desenvolvimento de materiais de alta produtividade com maior teor de fibra, como é o caso da cana-energia (DINIZ *et al.*, 2019; GRASSI e PEREIRA, 2019).

Segundo Matsuoka *et al.* (2014), a cana-energia é um tipo de cana-de-açúcar resultante do cruzamento genético de híbridos interespecíficos derivados dos ancestrais *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum*. O resultado do retrocruzamento é uma cana mais robusta, com maior teor de fibra e maior potencial produtivo. Com elevado rendimento de fibra, a cana-energia é rústica e resistente a condições de estresse e à presença de pragas e de doenças. Uma de suas principais vantagens é a flexibilidade. O cultivo da cana-energia é menos exigente do solo, da água e da disponibilidade nutricional. Assim, o plantio pode ser realizado em áreas de menor fertilidade, reservando áreas agricultáveis para a produção alimentícia, proporcionando maior estabilidade para agroindústria canavieira. Além disso, por produzir um número maior de colmos em relação à cana tradicional, pode promover um maior número de mudas por área. Este fato resulta em uma maior eficiência energética no seu cultivo, ou seja, mais energia produzida por unidade de energia gasta ao se considerar toda a cadeia de produção

(MATSUOKA *et al.*, 2012; HILL *et al.*, 2006). A Tabela 1 apresenta as diferenças agronômicas entre uma variedade de cana-energia e uma cana-de-açúcar comercial. Em relação à produtividade, as variedades de cana-energia disponíveis comercialmente, já são capazes de produzir 2-3 vezes mais que a cana-de-açúcar, aproximadamente  $180 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ , com um custo de produção que é metade do considerado para variedades comerciais de cana-de-açúcar (DOS SANTOS *et al.*, 2016). A explicação para a diferença na produtividade de biomassa entre a cana-de-açúcar e a cana-energia é a forma que a sacarose é priorizada, sendo utilizada como carboidrato reserva para cana-de-açúcar comum, enquanto, na cana-energia o produto fotossintetizado é principalmente desviado para a função estrutural, ou seja, na produção de fibra. Essa é a estratégia da cana-energia de aumentar o teor de fibras para suportar condições adversas de crescimento. Portanto, o vigor e resiliência das plantas são ampliados, permitindo uma maior produção de biomassa por unidade de área (MATSUOKA e RUBIO, 2019).

Tabela 1- Comparação entre a cana-de-açúcar e a cana-energia

Características	Cana-de-açúcar	Cana-energia*
Fibra (%)	17,4	27,0
Açúcares (%)	12,6	8,5
Produtividade (massa verde em $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$ )	92	180
Produtividade (fibra em $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$ )	16,0	48,6
Produtividade (açúcares em $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$ )	11,6	15,3
Exigência em fertilidade	Alta	Média
Resistência a pragas e doenças	Baixa	Média
Colheitas (por ciclos)	5	10

\*Variedade Vertex 1 cultivada no Estado de São Paulo.

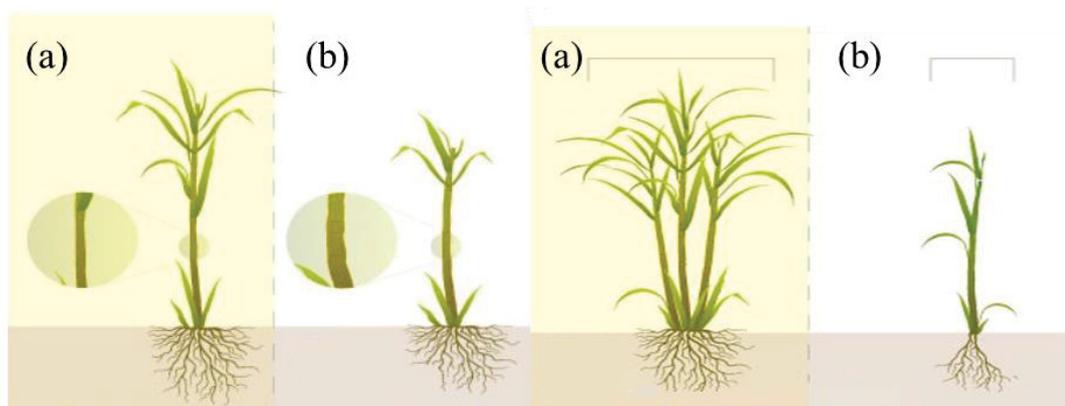
Fonte: Adaptado de Grassi e Pereira (2019).

Segundo Diniz *et al.* (2019), a cana-de-açúcar pode ser classificada em: (a) tipo I, que são variedades de cana comerciais com alto teor de açúcar (13% de sacarose e 12% de fibra); (b) tipo II, que também possui alto teor de açúcar, mas com um aumento no teor de fibras (13% de sacarose e >14% de fibra); (c) tipo III, já considerado um tipo de cana-energia, cujo desenvolvimento objetiva aumentos significativos na produção de biomassa (<12% de sacarose e >22% de fibra); e (d) tipo IV, que é uma cana-energia que possui finalidade específicas para a cogeração de energia (<5% de sacarose e >22% de fibra).

Devido a sua rusticidade, a cana-energia apresenta algumas características que a distinguem da cana-de-açúcar tradicional. Entre essas características estão a presença de lâmina

de folhas mais estreitas, uma haste mais fina e um perfilhamento mais profuso, além de permitir um número maior de colheitas graças ao rizoma de *Saccharum spontaneum* (Figura 1 ).

Figura 1- Diferenças físicas entre os cultivares (a) cana-energia (b) cana-de-açúcar



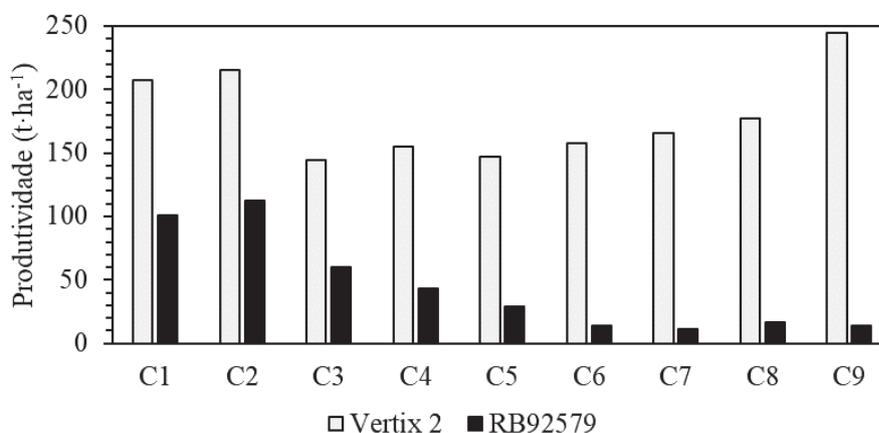
Fonte: Adaptado de GRANBIO, 2023.

Enquanto a cana-de-açúcar tradicional apresenta declínio na produção a partir do primeiro corte, a touceira da cana-energia vai perfilhando em decorrência da distribuição dos rizomas e com isso mantém a sua produtividade, estendendo a longevidade do canavial por dez anos ou mais (DA SILVA *et al.*, 2020). A Figura 2 demonstra que a produtividade potencial da cana-energia pode aumentar ao decorrer dos ciclos de colheita.

### 3.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é a fonte mais abundante de carbono orgânico do planeta, constituindo a parede celular vegetal. A biomassa é composta, majoritariamente, por macromoléculas de celulose, hemiceluloses e lignina, além de outros componentes minoritários (AMERAN *et al.*, 2019; MORAIS *et al.*, 2020). O percentual de cada componente da parede celular é variável de acordo com a espécie, local de cultivo, colheita e até mesmo em relação ao tempo e condições de estocagem. Os componentes minoritários podem ser classificados em substâncias inorgânicas e orgânicas (FENGEL e WEGNER, 1989).

Figura 2- Produtividade potencial da cana-energia comparada a cana-de-açúcar em nove ciclos de colheita



Fonte: Nuseed, safra 2022/2023.

As frações orgânicas são geralmente responsáveis por características como cor, sabor e cheiro da planta que são intitulados extraíveis. Esses compostos podem incluir terpenos, estilbenos, flavonoides, ácidos fenólicos, gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, lignanas e hidrocarbonetos (FENGEL e WEGENER, 1989). Além dos extraíveis, que geralmente são removidos por solventes, existem os componentes não-extraíveis, que são formados por proteínas, materiais pécticos e cinzas. As cinzas são frações inorgânicas responsáveis por funções específicas no metabolismo das plantas, sendo comum em biomassas como o bagaço de cana-de-açúcar a presença de sílica que pode ser absorvida do solo (CRUZ *et al.*, 2019). Além disso, outros compostos CaO, MgO, MnO, K<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>O, SrO, TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, podem ser encontrados nas cinzas do bagaço e palha da cana-de-açúcar, como mostra o estudo de Szczerbowski *et al.* (2014). Essa matriz é naturalmente resistente ao ataque de microrganismos e/ou enzimas, o que torna a estrutura extremamente recalcitrante, dificultando o processamento e isolamento dos principais componentes (BHUTTO *et al.*, 2017; ELIODÓRIO *et al.*, 2019).

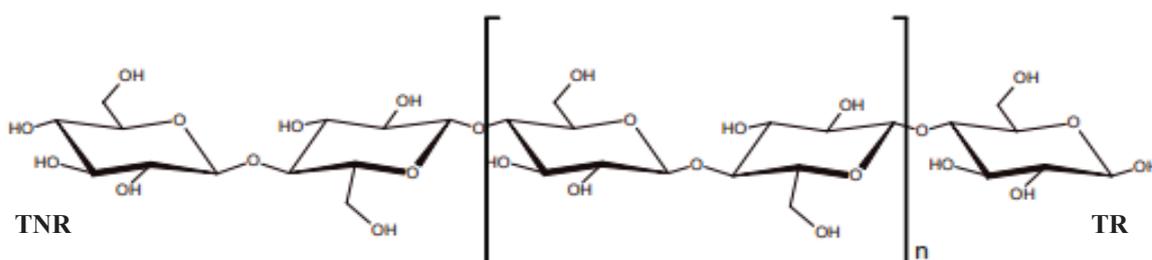
### 3.3 CELULOSE

A celulose é o polímero biogênico de maior ocorrência na natureza, sendo encontrada em uma grande variedade de organismos, como bactérias, algas e vegetais superiores. Nos materiais lignocelulósicos, destaca-se sua função estrutural constituindo entre 40-50% da parede celular de plantas superiores (RAMOS *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2021).

Quimicamente, a celulose é definida como um homopolissacarídeo linear formado por unidades de anidro-D-glucopiranosose unidas por ligações  $\beta$ -glicosídicas entre as posições 1 e 4 dos anéis piranosídicos. A ligação  $\beta$ -(1,4) entre duas unidades de glucose estabelece uma celobiose (4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-glucopiranosose), que sob uma perspectiva conformacional é a unidade básica repetitiva da celulose (Figura 4) (RAMOS, 2003).

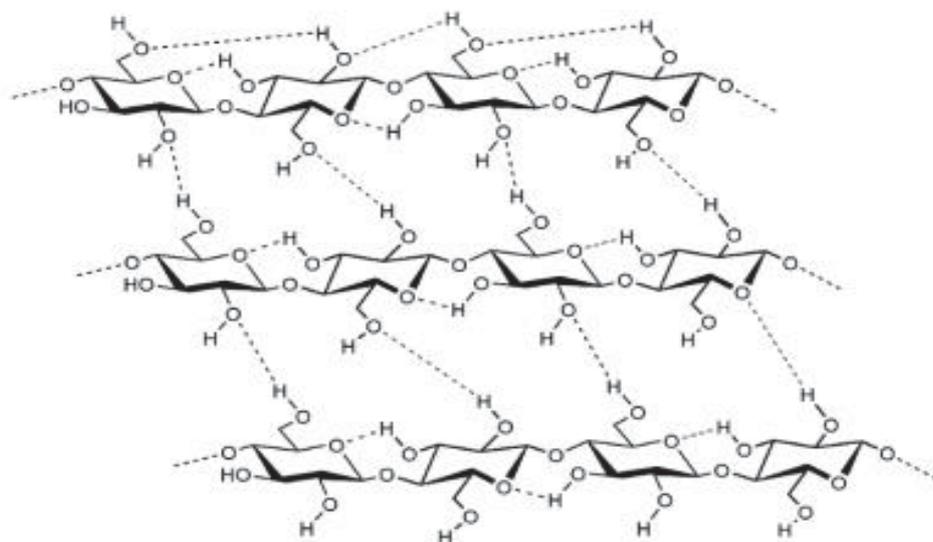
O tamanho da cadeia de celulose normalmente é especificado pelo seu grau de polimerização (GP), que corresponde ao número médio de unidades de D-glucose presentes em uma cadeia. Tal valor pode variar de acordo com o material, com o grau de maturação da parede celular e com o processamento e/ou envelhecimento das fibras (FENGEL e WENEGER, 1989). Sabe-se que as moléculas D-glucose possuem conformação em cadeira  ${}^4C_1$ , onde todas as hidroxilas se encontram em posição equatorial ao plano do anel hemiacetálico, que assume uma estrutura conformacional *quasi*-planar. Além disso, a orientação equatorial da ligação  $\beta$ -glicosídica resulta na formação de cadeias lineares, que formam uma rede de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares envolvendo o oxigênio hemiacetálico e as hidroxilas dos carbonos (C2, C3 e C6). A interação entre várias cadeias celulósicas lineares dá origem a fibrilas elementares estruturalmente estáveis, com alto grau de cristalinidade (DING e HIMMEL, 2006) e elevada resistência à tensão (BHAT *et al.*, 2019; SJÖSTRÖM, 1993) (Figura 4). Como consequência, a celulose cristalina é insolúvel em água e na maior parte dos solventes orgânicos. Termodinamicamente, existe um limite para crescimento do agregado cristalino, a partir do qual a sua organização é perdida e as moléculas passam a adquirir uma disposição e direcionamento randômico, formando, assim, regiões de instabilidade que são denominadas amorfas. Vale ressaltar que a equivalência entre as regiões cristalinas e amorfas podem variar de acordo com a origem e o processamento do material.

Figura 3- Cadeia linear da celulose, evidenciando a celobiose como sua unidade conformacional básica, os terminais não redutor (TNR) e redutor (TR), com a hidroxila anomérica em orientação equatorial



Fonte: Adaptado de SJÖSTRÖM e WESTERMARK, 1999.

Figura 4- Ligações de hidrogênio intra e intermoleculares entre as cadeias de celulose

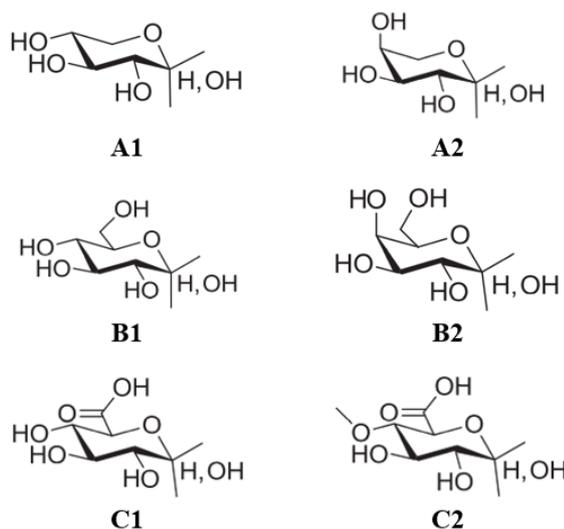


Fonte: FENGEL e WEGENER, 1989.

### 3.4 HEMICELULOSES

As hemiceluloses correspondem a uma família de heteropolissacarídeos que ocorrem juntamente com a celulose na parede celular, cuja natureza química varia de acordo com a espécie e com o tecido vegetal onde elas se encontram (LUO *et al.*, 2019; RAMOS *et al.*, 2016). Esses polissacarídeos são formados por uma ampla variedade de monômeros, podendo estar presentes unidades distintas de pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (ácido  $\beta$ -D-glucurônico, ácido 4-O-metil-D-glucurônico) (FENGEL e WENEGER, 1989; SJÖSTRÖM, 1993). A Figura 5 apresenta os principais monossacarídeos presentes nas hemiceluloses, que normalmente apresentam cadeias ramificadas devido à presença de diferentes unidades monoméricas com hidroxilas passíveis de ser substituídas, permitindo assim a formação de diferentes arranjos macromoleculares. Em virtude dessa diversidade estrutural e do arranjo espacial das cadeias, as oportunidades de formação de ligações de hidrogênio são mais restritas, caracterizando um material de menor organização molecular e mais suscetível à degradação térmica, biológica ou química em comparação à celulose (QASEEM *et al.*, 2021; RAMOS, 2003). A cadeia principal das hemiceluloses pode ser formada por unidades de xilose (xilanas), manose (mananas) e na combinação destes com glucose (xiloglucanas e glucomanas).

Figura 5- Representação das fórmulas estruturais das unidades monoméricas mais comumente encontradas nas hemiceluloses: (A1) D-xilose, (A2) L-arabinose, (B1) D-glucose, (B2) D-galactose, (C1) ácido-D-glucurônico e (C2) ácido 4-*O*-metil-D-glucurônico



Fonte: Adaptado de GÍRIO *et al.*, (2010).

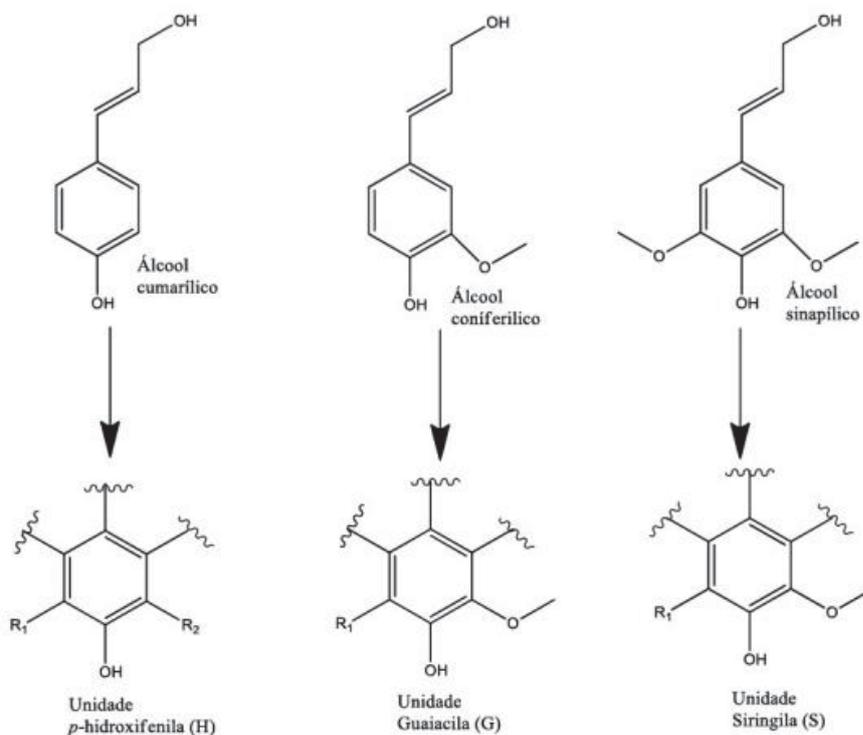
As hemiceluloses encontram-se fortemente associadas às cadeias de celulose por meio de ligações de hidrogênio e se encontram ligadas covalentemente à lignina. Além disso, ligações adicionais podem ser formadas entre resíduos de L-arabinose com os ácidos ferúlico e cumárico (DODD e CANN, 2009). As hemiceluloses de gramíneas, como a cana-de-açúcar são compostas, majoritariamente, por arabinoglucuronoxilanas, enquanto as xiloglucanas encontram-se em menor quantidade. As arabinoglucuronoxilanas possuem cadeia principal de xilana contendo ramificações de arabinose e ácido 4-*O*-metil-D-glucurônico, além de grupos acetila e outros componentes minoritários, enquanto as xiloglucanas possuem cadeia principal de glucanas substituídas por unidades de xilose (VANDENBERGHE *et al.*, 2021; GÍRIO *et al.*, 2010).

A Figura 6 apresenta a representação hipotética de uma 4-*O*-metil-glucuronoarabinoxilanas, onde grupos acetila (em roxo) e unidades de L-arabinose (em vermelho) e de ácido 4-*O*-metil-D-glucurônico (em verde) se encontram substituídas em uma cadeia principal linear, formada por unidades de D-xilose ligadas por enlaces glicosídicos do tipo  $\beta$ -(1,4).



herbáceas) como a cana-de-açúcar contêm os três precursores básicos em quantidades variáveis, sendo classificadas como ligninas HGS (RAMOS, 2003; RALPH *et al.*, 2004; SUOTA *et al.*, 2021).

Figura 7- Monômeros formadores da estrutura da lignina



Fonte: Adaptado de FONTES, 2020.

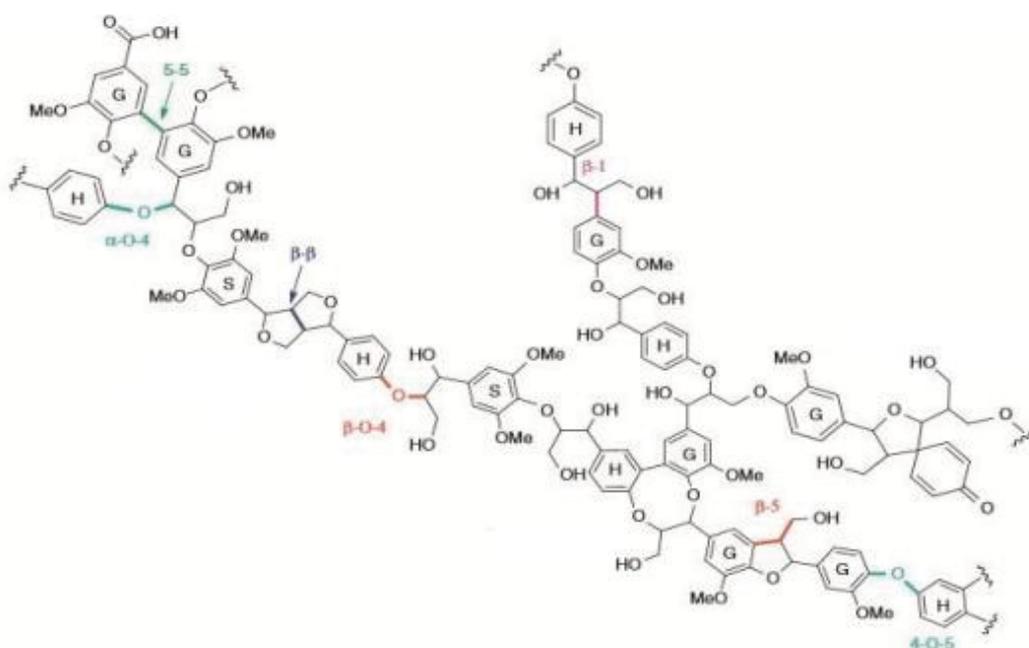
A estrutura da lignina é extremamente complexa, formada a partir de diferentes ligações carbono-carbono entre cadeias alifáticas ( $\beta$ - $\beta'$ ,  $\alpha$ - $\alpha'$ ,  $\alpha$ - $\beta'$ ), entre cadeias alifáticas e anéis aromáticos ( $\beta$ -5',  $\beta$ -1',  $\alpha$ -1',  $\beta$ -6') e entre carbonos aromáticos (5-5'), além de ligações éter envolvendo cadeias alifáticas e anéis aromáticos ( $\beta$ -O-4',  $\alpha$ -O-4') (ARNI, 2018; RALPH *et al.*, 2019). A Figura 8 esquematiza um fragmento estrutural de uma lignina.

### 3.6 PRÉ-TRATAMENTO

A dificuldade de se converter materiais lignocelulósicos em biocombustíveis deve-se à recalcitrância da parede celular vegetal, associada à complexidade estrutural das macromoléculas nela presentes (celulose, hemiceluloses e lignina) (YOO *et al.*, 2020; SARKER *et al.*, 2021). Para a utilização desses materiais em processos de bioconversão, é imprescindível a realização de uma etapa de pré-tratamento que seja capaz de reduzir o grau de associação molecular que existe entre os seus principais constituintes estruturais. No entanto, a

escolha da técnica adequada requer um vasto conhecimento sobre a composição química da matéria-prima (RAMOS *et al.*, 2019; BENJAMIN *et al.*, 2014). Segundo Puligundla *et al.*, (2016), um pré-tratamento deve ser acessível, de baixo custo, não gerar a produção de resíduos, promover alta digestibilidade da celulose e baixa decomposição de carboidratos, além de ter condições operacionais seguras e de baixo impacto ambiental. Os principais métodos são baseados em processos físicos, químicos, biológicos ou combinados (ZHANG *et al.*, 2021). A Tabela 2 apresenta algumas das principais técnicas utilizadas para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.

Figura 8 - Esquema da estrutura de um fragmento de lignina e de suas principais ligações



Fonte: Adaptado de JOFFRES *et al.* (2013).

A explosão a vapor é uma das principais técnicas para o fracionamento de materiais lignocelulósicos. As reações ocorrem quando o material é rapidamente aquecido pela introdução de vapor saturado a altas temperaturas e permanece em contato com este por alguns minutos, sendo, em seguida, submetido a uma rápida descompressão à condição atmosférica, quando é transferido para um ciclone adaptado a um vaso coletor (BHUTTO *et al.*, 2017; JACQUET *et al.*, 2015; JUNPENG *et al.*, 2022). Essa técnica pode ser realizada na ausência ou na presença de catalisadores exógenos, tendo destaque a impregnação da biomassa com soluções diluídas de  $H_2SO_4$  ou  $H_3PO_4$  (NEVES *et al.*, 2016).

Tabela 2- Principais técnicas de pré-tratamentos para a biomassa lignocelulósica

<b>Processo</b>	<b>Descrição</b>		
BIOLÓGICO	Fungo Bactéria Enzimas	Biodegradação da lignina por lacases e peroxidases. Alta seletividade em tempos de pré-tratamento muito longos. Organismos geneticamente modificados que são capazes de converter biomassa em combustíveis e produtos químicos (bioprocessamento consolidado). Remoção seletiva de componentes de alta massa molar em matrizes celulósicas usando lipases, enzimas degradantes de lignina e hidrolases.	
	FÍSICO	Moagem Microondas Ultrassom	Redução do tamanho das partículas e aumento da área de superfície do substrato para processos de conversão biológica ou química. Ruptura e inchaço facilitando a remoção de hemiceluloses e lignina; os tempos de aquecimento e reação são bastante reduzidos. Modificação da estrutura por cavitação; ligações do complexo de lignina-carboidratos são clivadas.
	QUÍMICO	Hidrólise ácida Extração alcalina Líquido iônico Oxidação CO <sub>2</sub> supercrítico	Inchaço de celulose e hidrólise parcial de hemicelulose; coalescência e condensação de lignina. Extração de lignina e hidrólise parcial de ligações aril-éter, reduzindo sua massa molar média. Extração de carboidratos ou lignina devido à sua alta polaridade e forte interações intermoleculares com a matriz celulósica. Deslignificação com oxidantes fortes como hipoclorito, radicais de oxigênio e ozônio. Hidrólise ácida parcial de hemiceluloses, redução da cristalinidade da celulose aumentando a acessibilidade do substrato.
COMBINADO	Explosão a vapor <i>Organosolv</i> AFEX SPORL	Hidrólise ácida de hemiceluloses, modificação e redistribuição de lignina, pode ser realizado na ausência ou presença de catalisadores ácidos ou básicos. Deslignificação seletiva da biomassa, cuja eficiência pode ser aumentada pela adição de um catalisador ácido exógeno. Remoção parcial de hemiceluloses e lignina; mudanças no estado cristalino da celulose (de I para III). Pré-tratamento de sulfito para superar a recalitrância de lignocelulose, desenvolvido a partir da polpação de sulfito para melhorar a hidrólise enzimática.	

Fonte: Adaptado RAMOS *et al.*, 2019.

Quando catalisadores exógenos não são adicionados ao sistema, o processo de explosão a vapor é denominado de auto-hidrólise porque a quebra das ligações glicosídicas é catalisada pelos ácidos liberados durante o processo. Todos os componentes da biomassa sofrem hidrólise, porém, as hemiceluloses são os mais susceptíveis a este tipo de reação. Quando expostos a altas temperaturas, os grupamentos acetila presentes nas hemiceluloses são hidrolisados a ácido acético e este catalisa a quebra das ligações do complexo lignina-carboidrato, acarretando a liberação de monossacarídeos (arabinose, xilose e glucose) e oligossacarídeos hidrossolúveis no licor do pré-tratamento. Normalmente, sob condições menos severas, a celulose sofre apenas uma redução no seu grau de polimerização, permanecendo como resíduo fibroso (fração sólida) do qual a lignina despolimerizada pode ser extraída com solventes orgânicos ou meio alcalino. Com o aumento da severidade das condições operacionais, reações de desidratação de carboidratos são favorecidas, levando à formação de compostos como hidroximetilfurfural, furfural, ácido fórmico e levulínico cuja presença pode ser inibitória para a produção de etanol celulósico em altos rendimentos (NEVES *et al.*, 2016; RAMOS, 2000; JACQUET *et al.*, 2015). Além dos efeitos associados à hidrólise ácida, efeitos mecânicos de cisalhamento e descompressão explosiva introduzem mudanças físicas na estrutura da biomassa. De modo geral, a explosão a vapor resulta em mudanças substanciais em diversas propriedades da biomassa, incluindo densidade, tamanho de partícula, porosidade, hidrofobicidade e acidez, dentre outras (YU *et al.*, 2022; HAN *et al.*, 2010).

Os principais parâmetros de controle do processo de auto-hidrólise são a temperatura e o tempo de residência da biomassa na câmara de reação, dos quais depende a otimização de seu fracionamento em alto rendimento. Por isso, Overend *et al.* (1987) desenvolveram um modelo no qual essas variáveis de processo são combinadas em um único fator de severidade ( $S_o$ ) conforme a Equações (1) e (2)

$$S_o = \log R_o \quad (1)$$

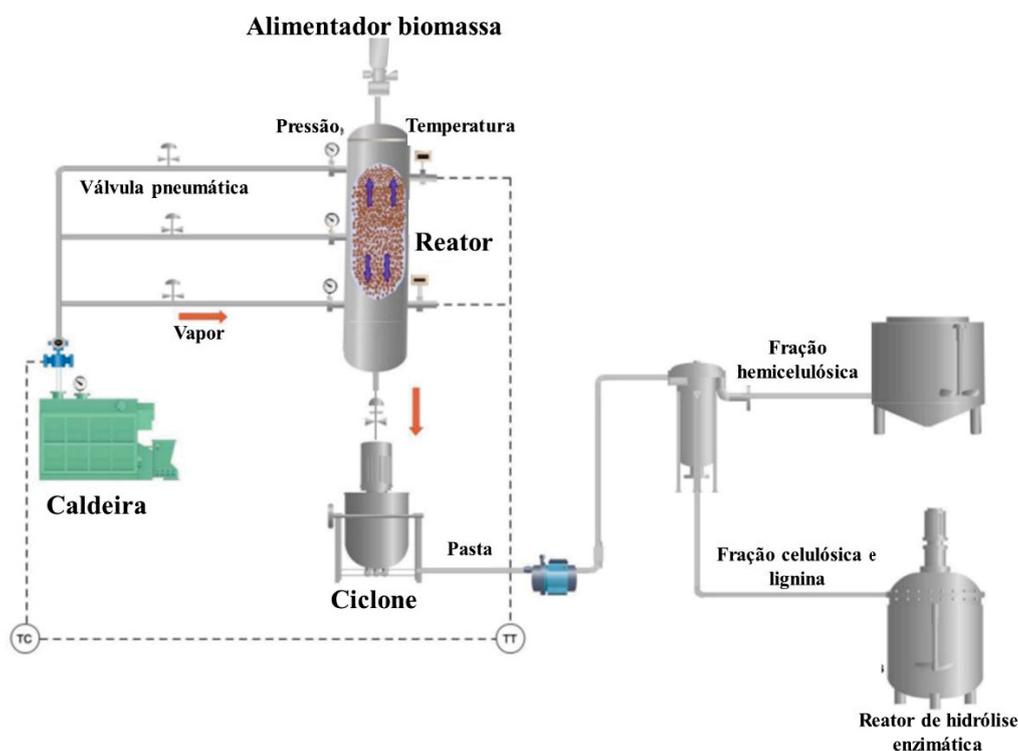
$$R_o = \int_0^t e^{\frac{T-100}{14,75}} dt \quad (2)$$

onde  $R_o$  é a ordenada da reação,  $t$  (min) é o tempo de reação,  $T$  (°C) é a temperatura do processo e 14,75 é a energia de ativação em condições em que o processo segue em cinética

de primeira ordem. O fator de severidade tem sido amplamente utilizado para comparar diferentes estudos relacionados a auto-hidrólise (FOCKINK *et al.*, 2018).

Originalmente, a explosão a vapor foi desenvolvida em modo batelada, mas esforços foram empregados para a sua aplicação de forma contínua (DUQUE *et al.*, 2016). A configuração batelada geralmente inclui uma caldeira geradora de vapor, um controlador automático para pressão e tempo de reação, um vaso de reação munido de válvulas de esfera de entrada e de saída, um ciclone projetado para desacelerar o material no momento da explosão e vaso coletor onde a biomassa pré-tratada é recebida após processo de descompressão. A simplificação de uma unidade de explosão a vapor em batelada está apresentada na Figura 9.

Figura 9- A unidade típica de explosão de vapor em batelada.

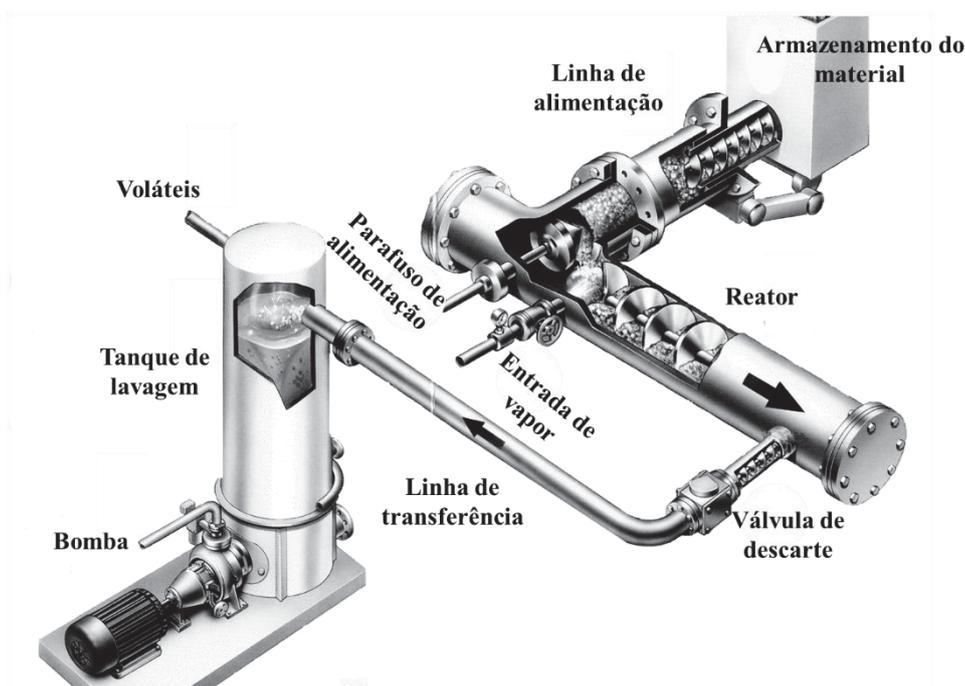


Fonte: Adaptado de Ruiz *et al.* (2021).

Para as operações de pré-tratamentos a vapor em sistemas contínuos, a biomassa é transferida automaticamente do silo de armazenamento para o digestor usando dispositivos de alimentação contínua como um alimentador coaxial, formando uma região de alta compressão que sela o reator. Um parafuso de ajuste fino permite controlar a entrada da biomassa no corpo do reator, onde é transportada por meio de uma rosca helicoidal/rotativa. Nessa mesma região do reator, o vapor saturado é introduzido por meio de bicos injetores e o contato desse

promove o amolecimento da biomassa, dando início ao seu cozimento. A biomassa percorre toda a extensão do reator, caracterizando assim um tempo de residência na temperatura estabelecida para o ensaio. Uma rosca helicoidal pré-dimensionada em função das propriedades físico-químicas do produto, posicionada a 90° em relação ao eixo do reator, desloca a biomassa pré-tratada gerando uma nova região de alta pressão, que é aliviada intermitentemente pelo acionamento de uma válvula de esfera. Desta forma, a pasta termoquímica produzida é direcionada a um tanque de lavagem por meio de uma linha de transferência, de onde seguirá para a etapa de hidrólise enzimática. Comparado ao processo em batelada, o modo contínuo oferece melhor controle das variáveis de operação, melhor transferência de calor e menor acúmulo de coprodutos. Entretanto, a operação do reator é muito mais complexa, bem como a sua manutenção. A Figura 10 apresenta um modelo esquemático de um reator contínuo.

Figura 10- Reator de explosão a vapor modelo contínuo



Fonte: Adaptado de autor desconhecido, 2023.

Um processo contínuo mais sofisticado de explosão de vapor em escala piloto foi demonstrado por Chen *et al.* (2013), que consiste em uma tremonha de recebimento de matéria-prima, um reator horizontal usado para pré-vaporização com impregnação de catalisador ácido, um reator vertical projetado para explosão a vapor em alta pressão, um tanque *flash* receptor e um separador sólido-líquido no final do processo. Dentre as principais vantagens do pré-tratamento por explosão a vapor, merece menção o fato de ser ajustável para

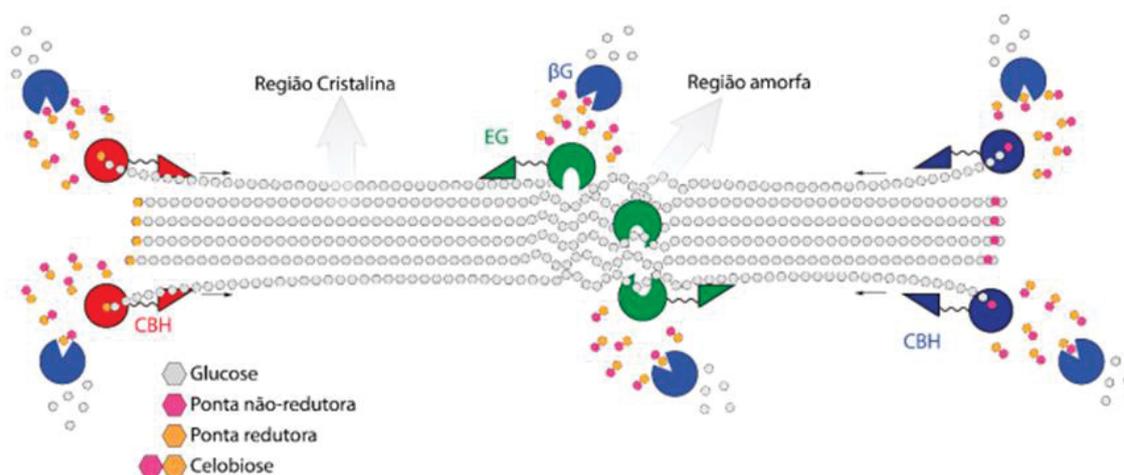
diferentes tipos de biomassa, operar em alto teor de sólidos totais, ser adaptável ao uso de catalisadores exógenos, apresentar altos rendimentos de recuperação de glucanas, gerar substratos com baixos teores de hemiceluloses e produzir bons substratos para hidrólise enzimática. Além disso, trata-se da tecnologia básica que instrumenta diversas plantas piloto e instalações pré-comerciais já existentes mundo afora. Por outro lado, as principais desvantagens dessa técnica de pré-tratamento são a presença de inibidores de fermentação no licor de pré-tratamento (fração hidrossolúvel), que decorre majoritariamente da desidratação de pentoses, e o consumo energético, que depende das condições operacionais do processo (RAMOS, 2003; YU *et al.*, 2022; DUQUE *et al.*, 2016; SUI e CHENG, 2015).

### 3.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Uma vez pré-tratada sob condições adequadas, a biomassa pode ser submetida à hidrólise pela ação de enzimas celulolíticas, que liberam carboidratos passíveis de fermentação a partir da conversão dos polissacarídeos presentes no material (SILVEIRA *et al.*, 2015). O complexo celulásico normalmente empregado para a despolimerização da celulose é composto majoritariamente por três classes de hidrolases: endoglucanases (EG), exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) e  $\beta$ -glucosidades (PRAJAPATI *et al.*, 2018). Essas enzimas podem ser secretadas por diferentes microrganismos, como bactérias e fungos, porém, as celulases mais utilizadas industrialmente são oriundas do fungo *Trichoderma reesei* (ZHANG *et al.*, 2021). A hidrólise enzimática acontece pela interação sinérgica entre endo- e exo-glucanases, fruto da complementariedade entre os seus modos de ação. As endoglucanases atuam de forma randômica ao longo da cadeia de celulose, ocasionando um decréscimo significativo de seu grau de polimerização e promovendo a formação de novos terminais redutores e não redutores. Esse modo de ação é atribuído ao seu sítio catalítico, cuja forma em fenda permite a ação catalítica em qualquer ponto ao longo da cadeia. Por consequência, sua atividade pode ser determinada pela diminuição da viscosidade do substrato, em decorrência do decréscimo de seu grau de polimerização (LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999; PIRICH *et al.*, 2020; RAMOS, 2000). Em seguida, tem-se a ação das exoglucanases, também denominadas celobiohidrolases (CBH) que atuam de forma progressiva em regiões terminais redutoras (CBHI) e não redutoras (CBHII), promovendo a sua despolimerização gradativa pela remoção de unidades de celobiose. Para exercer a sua atividade catalítica, as exoglucanases exigem que a cadeia de celulose adentre no seu túnel catalítico, promovendo a solubilização gradual do substrato. Finalmente, as  $\beta$ -glucosidades

hidrolisam a celobiose em glucose. Vale salientar que as enzimas são suscetíveis à inibição pelo acúmulo de produto; assim, a glucose liberada inibe as  $\beta$ -glucosidades, acarretando a inibição das exoglucanases devido ao acúmulo de celobiose e comprometendo a eficiência do sinergismo endo-exo (SILVEIRA *et al.*, 2015; PIRICH *et al.*, 2020). A Figura 11 demonstra o sinergismo existente entre estas enzimas durante hidrólise da celulose.

Figura 11- Modo de ação catalítica de celulases durante hidrólise da celulose



Fonte: Adaptado de PIRICH *et al.* (2020).

Para garantir altos níveis de conversão, complexos enzimáticos podem conter enzimas auxiliares, bem como proteínas não catalíticas. Entre as enzimas auxiliares mais importantes, destacam-se as monooxigenases lítica de polissacarídeos (LPMOs), que são responsáveis por clivar ligações glicosídicas por meio de uma reação de oxidação (GUO *et al.*, 2023). Já as proteínas não catalíticas, conhecidas como indutoras de amorfogênese, desempenham papel vital ao facilitar a ação das endoglucanases. Um exemplo de proteína auxiliar é a suolenina, que é capaz de romper as ligações de hidrogênio da estrutura cristalina da celulose, favorecendo a acessibilidade das celulases ao substrato (AGRAWAL *et al.*, 2021). De acordo com as condições empregadas durante o pré-tratamento, parte das hemiceluloses podem permanecer no material. Desta forma, para uma hidrólise eficiente desse tipo de substrato, é necessário a adição de hemicelulases, como xilanases, glucomananases, galactomananases,  $\beta$ -xilosidades, entre outras, cuja presença depende da natureza química das hemiceluloses remanescentes (ZHANG *et al.*, 2021).

As seguintes etapas ocorrem durante a hidrólise da celulose: adsorção das celulases na superfície da celulose, a formação de um complexo ativo enzima-substrato, a hidrólise da celulose com a liberação de produtos e a dessorção das celulases para o meio (AGRAWAL *et*

*al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021). Devido a necessidade de adsorção das enzimas ao substrato, uma fração considerável de celulasas apresenta em sua estrutura um módulo de ligação a carboidrato, denominado de CBM (*Carbohydrate Binding Module*), que se une ao domínio catalítico por um peptídeo flexível. Os CBMs atuam no reconhecimento dos diferentes componentes da parede celular vegetal e contribuem de forma substancial à atividade das enzimas, ao promover a aproximação entre o seu domínio catalítico e as cadeias celulósicas presentes na superfície do substrato (ZHANG *et al.*, 2021; GUO *et al.*, 2023).

A hidrólise enzimática é uma reação heterogênea que envolve fenômenos complexos de transferência de massa que influenciam a cinética da reação (AGRAWAL *et al.*, 2021; RAMOS *et al.*, 2020). A transferência de massa se expressa na mobilidade das enzimas sobre a camada estagnada de filme líquido que solvata as partículas sólidas da biomassa e, depois, pela difusão das enzimas na superfície da matriz. Deste modo, a taxa global de reação sofre influência desses fenômenos de resistência à transferência de massa. No início da hidrólise, a taxa global de reação é determinada pela sequência de três etapas: a rápida adsorção de celulasas em regiões prontamente acessíveis da superfície do substrato, uma fase intermediária em que a taxa de reação é moderada, atingindo conversões de 50 a 70% do substrato, e a desaceleração da hidrólise quando altos graus de conversão são atingidos (SUN *et al.*, 2022; AGRAWAL *et al.*, 2021; RAMOS *et al.*, 2020; ARANTES e SADDLER, 2010).

A hidrólise enzimática apresenta uma queda gradual na velocidade de reação ao longo do tempo, e essa redução pode estar relacionada às características dos substratos utilizados. Dentre as principais características, destacam-se a área superficial, tamanho de partícula, volume dos poros, grau de cristalinidade, grau de polimerização, quantidade de lignina e presença de compostos inibitórios (ZHANG *et al.*, 2021; RAMOS *et al.*, 2020). Vale ressaltar que essas características podem estar diretamente associadas ao pré-tratamento realizado.

A celulose cristalina apresenta uma estrutura tridimensional altamente organizada e compacta, o que dificulta a penetração das enzimas hidrolíticas e, conseqüentemente, reduz a taxa de hidrólise. Por outro lado, a celulose amorfa apresenta uma estrutura mais solta e desorganizada, que facilita a penetração das enzimas e aumenta a taxa de hidrólise. Muitos estudos indicam que a cristalinidade está inversamente relacionada com a eficiência de hidrólise e que as regiões cristalinas podem hidrolisar até 30 vezes menos do que as regiões amorfas da celulose (AGRAWAL *et al.*, 2021). O volume e tamanho dos poros desempenham um papel importante na adsorção e difusão das enzimas, sendo esperado que essas possam se difundir apenas em poros maiores que o raio hidrodinâmico da enzima (AGRAWAL *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021; ZOGHLAMI e PAES, 2019).

A presença da lignina e seus derivados podem interferir significativamente no acesso das celulasas ao substrato. Dependendo de sua concentração e distribuição, a lignina pode inibir as enzimas de três maneiras distintas: atuando como barreira física que restringe a acessibilidade da enzima, por meio da adsorção não produtiva das enzimas sobre a lignina, e por desativação devido à presença de compostos fenólicos derivados da lignina (GUO *et al.*, 2023; AGRAWAL *et al.*, 2021; RAMOS *et al.*, 2020).

Li *et al.* (2018) realizaram um estudo para avaliar o impacto de diferentes formas de lignina sobre a sacarificação da biomassa. A lignina resultante do processo *organosolv* apresentou ligação não produtiva com as enzimas, reduzindo assim a disponibilidade de enzimas livres para a hidrólise. Por outro lado, a lignina do processamento kraft, depositada na superfície da celulose, limitou de forma significativa a interação das enzimas com a matriz. Em outro estudo realizado por Qin *et al.* (2016), o desempenho da hidrólise enzimática foi avaliado com a adição gradual de compostos fenólicos, como a vanilina. Foi observado que o percentual de conversão diminuiu de 53 para 26% à medida que o teor de vanilina aumentou de 0 para 10 mg·mL<sup>-1</sup>. Por fim, é importante ressaltar que a hidrólise enzimática também pode ser afetada pelo comportamento das enzimas, incluindo a inibição retroativa devido ao acúmulo de produtos da reação, a desnaturação térmica e a perda de atividade enzimática devido ao efeito de cisalhamento ocasionado pela agitação. Todos esses fatores podem ser agravados pela presença de altas cargas de sólidos totais, condição essencial para tornar a produção de etanol celulósico economicamente viável (DENG *et al.*, 2023; AGRAWAL *et al.*, 2021).

Quando a hidrólise é conduzida com altas cargas de sólidos, quantidades significativas de biomassa são adicionadas ao meio reacional, diminuindo a quantidade de água livre disponível no meio. Isso dificulta os fenômenos de transferência de massa, tornando o processo menos eficiente. No entanto, cargas de sólidos acima de 15% são usualmente necessárias para produzir concentrações de açúcares altas o suficiente para que o processo fermentativo seja bem-sucedido (DENG *et al.*, 2023; SUN *et al.*, 2022; RAMOS *et al.*, 2020).

A água é importante para distribuir adequadamente o calor e as enzimas no meio de reação. Quando o teor de sólidos é superior a 20%, há a formação de suspensões densas em onde prevalece a ocorrência de interações fibrilares. Desse modo, a fração líquida é absorvida pela biomassa, aumentando a viscosidade e a exigência de energia para a mistura (RAMOS *et al.*, 2020). Além disso, altas cargas de sólidos podem causar perfis de concentração não homogêneos. Sun *et al.* (2023) afirmaram que rendimentos de hidrólise podem ser inferiores a 60% quando o teor de sólidos ultrapassa 25%. Para superar esses desafios, diversas

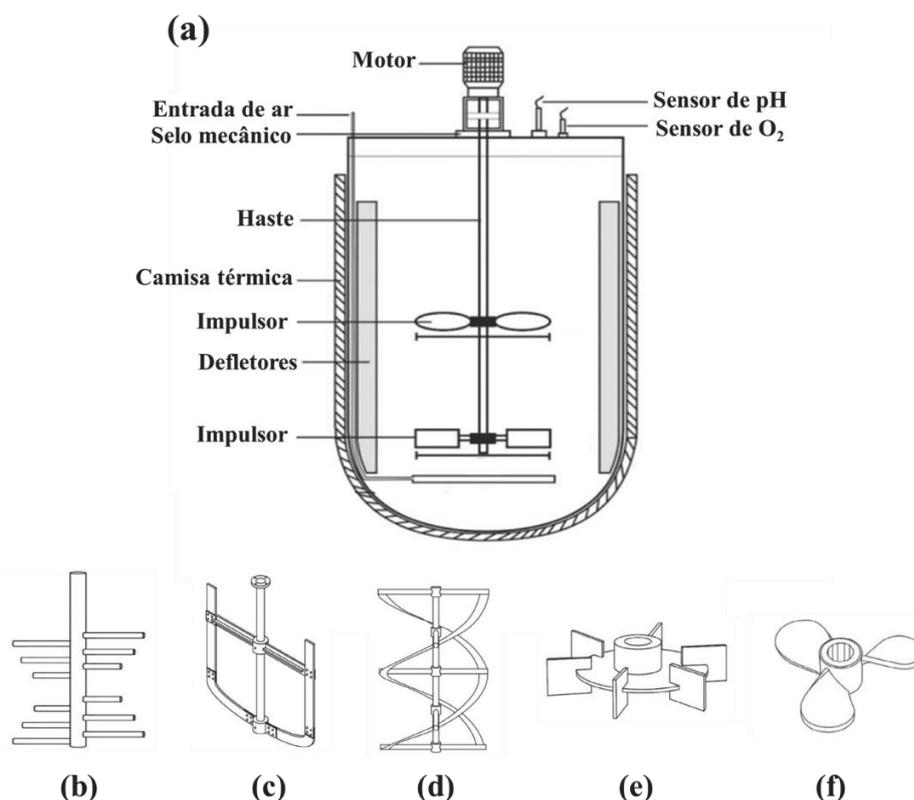
estratégias podem ser utilizadas, como a adição de surfactantes para reduzir a viscosidade do meio de reação, o emprego de um sistema de operação em batelada alimentada e a otimização do sistema de agitação (SUN *et al.*, 2022; DENG *et al.*, 2023). No processo de batelada alimentada, o material é adicionado gradualmente ao reator, permitindo que haja uma maior disponibilidade de água para as enzimas agirem, o que, por sua vez, melhora a eficiência da hidrólise e possibilita a obtenção de maiores concentrações de açúcares. Além disso, a batelada alimentada também ajuda a minimizar os problemas relacionados à mistura e à transferência de calor e massa durante a hidrólise (RAMOS *et al.*, 2020; PINO *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2013).

Xu *et al.* (2019) realizaram uma hidrólise enzimática com teor de sólidos totais igual a 22% empregando um sistema de batelada alimentada bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com solução alcalina. Foram aplicadas baixas dosagens de celulasas ( $4 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1}$  de biomassa), juntamente com enzimas acessórias e surfactantes não iônicos. A batelada alimentada influenciou na melhoria dos resultados e após 48 h um rendimento de 80% foi obtido, correspondendo a  $122 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de glucose. Cai *et al.* (2021) propuseram a hidrólise enzimática de espigas de milho submetida a um pré-tratamento químico (ácido e alcalino) em sistema de batelada alimentada, empregando teor de sólidos final de 25% e  $7,3 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1}$  de celulasas. Foram avaliados três modos de alimentação em batelada, sendo mais eficiente o baseado no início da reação a 10% com adições sequenciais de 3% a cada 5 h. O rendimento de glucose obtido foi de 84,4% em 96 h, que correspondeu a uma concentração de glucose igual a  $131,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Outra abordagem empregada para superar as limitações decorrentes do uso de altas cargas de sólidos é a otimização do tempo de liquefação, que pode ser alterado mudando a velocidade ou o sistema de agitação. Para isso diferentes configurações de biorreatores têm sido estudadas com o intuito de promover maiores rendimentos de glucose. De acordo com Pino *et al.* (2018), os biorreatores mais comuns são os de tanque agitado e os de membrana. Os biorreatores de tanque agitado consistem em um vaso cilíndrico com um ou mais impulsos que geram força no fluido, promovendo a circulação, distribuição e interação entre os componentes. O projeto desses reatores pode incluir defletores para impedir a geração de vórtices e melhorar as condições de mistura. Para aquecimento do sistema, diversas técnicas podem ser empregadas dependendo do tamanho do biorreator. Para reatores de pequena escala o recipiente pode ser equipado com aquecedor elétrico, enquanto para reatores de grande porte, o aquecimento pode ser fornecido por sistema interno de serpentina. Porém, em ambas as escalas, o sistema de camisas térmicas é o método mais comumente utilizado (AFEDZI, *et*

*al.*, 2022; PINO *et al.*, 2018; DU *et al.*, 2014). O sistema de agitação de um biorreator de tanque agitado consiste em um impulsor acoplado a um eixo agitador no centro do motor. Os padrões de fluxo, mistura e a taxa de cisalhamento do impulsor são os determinantes para manter a homogeneidade do meio. Misturas eficientes geralmente requerem uma entrada de energia comparativamente alta, que é determinada principalmente pelos tamanhos e formas do impulsor usado para produzir fluxo axial ou radial dentro do recipiente do biorreator (JASZCZUR e MÏYNARCZYKOWSKA, 2020). Esse tipo de biorreator e os principais impulsores utilizados estão dispostos na Figura 12 (PINO *et al.*, 2018; CORRÊA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2010). Ludwig *et al.* (2014) apresentaram resultados satisfatórios ao utilizar um biorreator de tanque agitado equipado com um agitador helicoidal segmentado. O reator vertical foi especialmente desenvolvido para hidrolisar eficientemente a biomassa lignocelulósica com alto teor de sólidos. O agitador foi caracterizado de acordo com o comportamento de mistura e a entrada de energia, o que resultou em um aumento de 76% e 82% no rendimento de glucose em comparação com o sistema de frasco agitado em 48 h a um teor de sólidos de 20%.

Figura 12- (a) Desenho de um biorreator de tanque agitado equipado com dois impulsores (b) misturador Peg (c) impulsor de âncora (d) impulsor de fita helicoidal (e) turbina de Rushton (f) impulsor orelha de elefante



Fonte: Adaptado de Corrêa *et al.* (2016) e Afedzi *et al.* (2022).

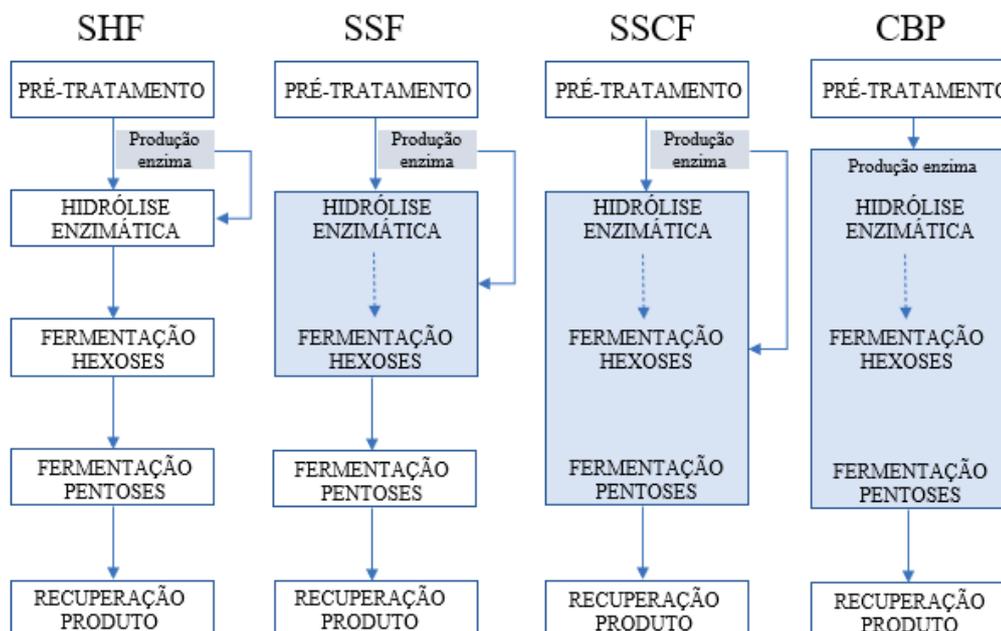
Os biorreatores de membrana são sistemas que combinam uma reação biológica com um método de separação. Eles são utilizados para aumentar a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica com o objetivo de superar o efeito inibitórios dos produtos. Com a utilização de uma membrana, é possível remover seletivamente os inibidores produzidos, enquanto as enzimas são retidas dentro do reator, permitindo recuperar e reutilizar o biocatalisador (AL-MARDEAI *et al.*, 2023; PINO *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2006). Existem diferentes configurações de biorreatores que empregam a separação por membrana. A configuração mais comumente utilizada é a membrana acoplada no fundo de um biorreator de tanque agitado, onde a remoção do hidrolisado ocorre no mesmo recipiente. Essa configuração é conhecida como filtragem sem saída, que se refere ao uso de uma direção de fluxo perpendicular à posição da membrana. Os produtos de baixa massa molar, como glucose e celobiose, permeiam para a seção inferior do reator, resultando em uma conversão melhorada em comparação com um sistema convencional de tanque agitado (PINO *et al.*, 2018; PINELO *et al.*, 2009). Zhang *et al.* (2011) propuseram a hidrólise enzimática de palha de milho submetida a um pré-tratamento químico combinado (ácido e alcalino) com o uso de um biorreator de membrana em configuração sem saída. A conversão de hidrólise no biorreator de membrana foi de 94%, contra 77% para um biorreator contínuo utilizando as mesmas condições de reação.

Embora os biorreatores de membrana apresentem vantagens significativas na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, há várias limitações que restringem a sua aplicação em larga escala. Uma dessas limitações é a ocorrência de incrustações, causadas pela deposição do substrato na superfície da membrana, que podem afetar negativamente o seu desempenho. Tais incrustações podem resultar na redução do fluxo de permeado, bem como modificação da permeabilidade e da seletividade da membrana (AL-MARDEAI *et al.*, 2023; PINO *et al.*, 2018).

### 3.8 PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A otimização das etapas de hidrólise enzimática e fermentação é determinante para viabilizar economicamente a produção de etanol celulósico. Várias configurações já foram desenvolvidas até o momento e as quatro principais se encontram registradas na Figura 13, que propõe a realização destas duas etapas em separado ou simultaneamente (PARISUTHAM *et al.*, 2014).

Figura 13- Configurações disponíveis para o processamento da biomassa lignocelulósica



Fonte: Adaptado de PARISUTHAM *et al.*, 2014.

A Hidrólise Enzimática Separada da Fermentação (*Separate Hydrolysis and Fermentation* - SHF) apresenta maior flexibilidade para o controle das condições operacionais, já que as duas operações ocorrem em unidades distintas. A principal vantagem deste processo é que, ao estarem separadas, ambas podem ser realizadas nas condições ótimas de temperatura, sendo esta mais alta para a atividade enzimática (45-50°C) e mais baixa para a fermentação (28-30°C) (SHARMA *et al.*, 2021). Além disso, a lignina de hidrólise pode ser facilmente recuperada por filtração após a hidrólise, facilitando assim a sua destinação para uso energético ou aplicações mais nobres. Em contrapartida, o alto custo de produção, a baixa produtividade, o alto risco de contaminação e a possível inibição pelos produtos da reação sobre o modo de ação das celulasas são algumas das principais desvantagens associadas a esse método (TOOR *et al.*, 2020; MALIK *et al.*, 2022).

Na Sacarificação e Fermentação Simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Fermentation* - SSF), as reações são realizadas em um único reator. Essa abordagem permite uma redução substancial do tempo de processamento, já que a fermentação dos açúcares acontece na medida em que haja a liberação destes por hidrólise enzimática. Desta forma, problemas de inibição enzimática ocasionados pelo acúmulo de mono e dissacarídeos são reduzidos. A principal desvantagem deste processo está relacionada às diferentes condições ótimas de pH e temperatura das etapas hidrólise e fermentação, além da recuperação de uma lignina de hidrólise mais contaminada com biomassa microbiana e outros componentes do

meio (FERNANDES-KLAJN *et al.*, 2018; SOTI; LENAERTS; CORNET, 2018, VOHRA *et al.*, 2014).

É importante salientar que os dois processos mencionados acima podem envolver a cofermentação de hexoses e pentoses e, nesses casos, faz-se uso das nomenclaturas SHCF (*Separate Hidrolysis and Cofermentation*) e SSCF (*Simultaneous Saccharification and Cofermentation*). Este processo pode ser conduzido por um único microrganismo, usualmente modificado geneticamente, ou pelo uso simultâneo de mais de um microrganismo. Como o aproveitamento das pentoses é essencial para aumentar rendimentos e assim a economicidade do processo, um dos gargalos da indústria de etanol celulósico é a disponibilidade de microrganismos fermentativos capazes de metabolizar pentoses e hexoses indistintamente e com a mesma eficiência (MILESSI, 2017; ALMEIDA e NASCIMENTO, 2021).

Uma configuração alternativa que tem sido proposta é o bioprocessamento consolidado (*Consolidated bioprocessing - CBP*). A tecnologia CBP utiliza um único microrganismo para a produção de enzimas, sacarificação e processo de fermentação em uma única etapa. Essa abordagem é uma alternativa promissora para melhorar a eficiência do processo, eliminar a adição de enzimas externas, minimizar a inibição sofrida pelas celulasas e diminuir o custo total do processo devido à redução de várias operações unitárias (PARISUTHAM *et al.*, 2014; TOOR *et al.*, 2020). Apesar de ser considerada uma abordagem promissora para a produção de etanol celulósico, o estabelecimento do CBP se encontra em estágio prematuro devido às limitações no emprego de um microrganismo capaz de executar com eficiência todas as etapas em conjunto (TOOR *et al.*, 2020).

### 3.9 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE HIDROLISADOS ENZIMÁTICOS

A fermentação é a etapa na qual ocorre a conversão dos açúcares em etanol e outros compostos por intermédio de reações metabólicas realizadas por microrganismos (CUNHA *et al.*, 2020). Para que sejam considerados apropriados para fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, os microrganismos devem apresentar termotolerância, resistência a inibidores e, principalmente, possuir alta atividade fermentativa para carboidratos simples como glucose e xilose (ROBAK; BALCEREK, 2018). Industrialmente, a fermentação da glucose (hexose) é um processo bem estabelecido, sendo *Sacharomyces cerevisiae* a levedura mais empregada para a fermentação da sacarose, resultando assim no etanol de primeira geração (ONYEMA *et al.*, 2022; CUNHA *et al.*, 2020). Fazer uso pleno dos açúcares provenientes da biomassa (hexoses e pentoses) é um requisito fundamental para tornar a

produção de etanol lignocelulósico economicamente competitiva (LIU *et al.*, 2019; NDUBUISI *et al.*, 2023). Para isso, estudos vêm sendo realizados para selecionar e aprimorar microrganismos fermentadores de pentoses. Além disso, grandes esforços estão sendo realizados para modificar geneticamente a *Sacharomyces cerevisiae*, tornando-a capaz de fermentar xilose (CUNHA *et al.*, 2020; NDUBUISI *et al.*, 2023). Muitas espécies de leveduras possuem em seu genoma os genes codificadores para o consumo e metabolização de pentoses, mas apenas uma pequena porcentagem, é capaz de convertê-las a etanol. Dentre elas, destacam-se *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kudriavzevii* e *Spathaspora passalidarum* (NDUBUISI *et al.*, 2023). A *Pichia stipitis* está entre as primeiras leveduras a serem identificadas, além de, possuir um dos maiores rendimentos. Segundo Selim *et al.* (2018), essa cepa é capaz de consumir xilose e produzir etanol acima de  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $30^\circ\text{C}$  sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio. Dentre todas as leveduras não convencionais, a *Kluyveromyces marxianus* também tem se mostrado promissora para a produção de etanol a partir de glucose, devido ao seu potencial fermentativo a altas temperaturas ( $40$  a  $45^\circ\text{C}$ ). Essa termotolerância pode ser extremamente vantajosa para o desenvolvimento de processos SSF (NDUBUISI *et al.*, 2023; BAPTISTA e DOMINGUES, 2022).

Para a abordagem CBP algumas bactérias termofílicas anaeróbicas celulolíticas como *Thermoanaerobium mathranii*, *T. ethanolicus*, *T. brockii*, *C. thermosaccharolyticum*, *C. thermohydrosulfuricum* e fungos filamentosos como *Fusarium oxysporum* são apresentados como os microrganismos mais promissores (MALIK *et al.*, 2022).

Apesar de vários microrganismos apresentarem capacidade de fermentação, nenhum deles apresenta rendimentos de etanol e rusticidade próximos aos obtidos pela levedura industrial *Sacharomyces cerevisiae*. Graças ao seu uso intensivo em fermentações industriais, essa levedura possui capacidade fermentativa aprimorada e tolerância a condições adversas. Devido a esses fatores, esse organismo é o que mais sofre alterações genéticas visando a viabilidade econômica de usinas de segunda geração (CUNHA *et al.*, 2020).

### 3.10 ESTUDOS SOBRE ETANOL LIGNOCELULÓSICO

No processo de obtenção de E2G, o objetivo é desestruturar a parede celular e disponibilizar os polissacarídeos na forma de açúcares solúveis para o processo fermentativo. No entanto, devido à alta cristalinidade da celulose e forte interação entre os três componentes macromoleculares da parede celular vegetal (celulose, hemiceluloses e lignina), pré-

tratamentos devem ser realizados anteriormente à etapa de hidrólise para a formação dos açúcares e a subsequente etapa de fermentação para a obtenção do etanol (MANKAR *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2019).

Embora várias pesquisas tenham sido realizadas sobre as etapas na produção em escala industrial, os principais obstáculos que limitam o processo são a escolha do pré-tratamento ideal para a utilização seletiva da celulose e hemiceluloses, causando baixas perdas de carboidratos totais, e a intensificação das etapas de hidrólise enzimática e fermentação. De acordo com Penalva Santos *et al.* (2023), o processo de difusão das tecnologias de produção para o E2G ainda não se estabeleceu propriamente. Algumas indústrias têm investido em pesquisa e desenvolvimento para tornar a produção de etanol celulósico economicamente viável em escala comercial, como exemplo a Granbio e a Raízen.

A GranBio, localizada no Brasil, é uma empresa pioneira na produção de etanol celulósico. Em 2014, inauguraram uma usina em São Miguel dos Campos, Alagoas, projetada para produzir 82 milhões de litros de etanol por ano a partir da palha da cana-de-açúcar. A empresa tem investido em pesquisa e desenvolvimento para otimizar o processo de produção e torná-lo economicamente viável em escala comercial. A Raízen, por sua vez, é uma joint venture entre a brasileira Cosan e a anglo-holandesa Shell. Embora seja mais conhecida por sua produção de etanol a partir da cana-de-açúcar convencional, também estão envolvidos na pesquisa e desenvolvimento do etanol celulósico. A empresa possui uma planta capaz de produzir 40 milhões de litros de etanol celulósico por ano (PENALVA SANTOS *et al.*, 2023; NETO *et al.*, 2018).

Apesar dos muitos desafios, o etanol celulósico possui excelente potencial para suprir as demandas de combustíveis de forma sustentável. Com avanços tecnológicos na etapa de pré-tratamento, juntamente com o desenvolvimento de microrganismos modificados para as etapas de bioconversão, pode-se alcançar resultados satisfatórios e garantir a viabilidade de produção operacional das plantas industriais. No entanto, são necessários menores custos de produção e melhoria considerável na área de cultivo sem implicar na ampliação da fronteira agrícola (PENALVA SANTOS *et al.*, 2023; QIAO *et al.*, 2022). Considerando a complexidade envolvida na produção de etanol celulósico, diversos estudos avaliaram a diferença entre biomassas, bem como diversos tipos de pré-tratamento, cargas enzimáticas e configurações da hidrólise e fermentação. A Tabela 3 apresenta alguns estudos que produziram etanol a partir de diversas fontes de biomassa.

Tabela 3- Estudos sobre etanol de segunda geração

Estudo	Biomassa	Pré-tratamento	Carga enzimática	Organismo(s)	Principais resultados
BONDESSON e ZACHI, 2013	Palha de milho	Explosão a vapor com e ácido sulfúrico diluído como catalisador	7,5 FPU·g <sup>-1</sup> de Cellic CTec2 (Novozymes)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	O maior rendimento de glucose foi de 86%, obtido após pré-tratamento a 210°C por 10 min na ausência de catalisador exógeno, seguido de hidrólise enzimática. Usando ácido sulfúrico diluído, rendimento aumentou para 78% após pré-tratamento a 200°C por 10 min. Os maiores rendimentos de etanol e metano foram obtidos a partir do material pré-tratado na presença de ácido sulfúrico. A concentração máxima de etanol obtida foi de 22 g·L <sup>-1</sup> , com rendimento igual a 80%.
DA SILVA <i>et al.</i> , 2015	Bagaço de cana-de-açúcar	Extração alcalina (hidróxido de sódio diluído) sono-assistida	10 FPU·g <sup>-1</sup> , 10% de sólidos secos da Cellic®CTec3 (Novozymes)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Thermosac Dry	O melhor desempenho foi alcançado a 70°C com 140 W de potência de sonicação usando 0,125 g de NaOH·g <sup>-1</sup> biomassa seca, resultando em uma recuperação total de glucose de 95,8% em relação ao conteúdo total de glucanas do material original. A eficiência de fermentação do melhor substrato hidrolisado foi de 91,4%, enquanto valores menores de 87,1 e 80,0% foram obtidos para o bagaço de cana explodido a vapor seguido ou não de lavagem alcalina, respectivamente.
FOCKINK <i>et al.</i> , 2015	Resíduos do processamento de algodão	Extração alcalina (hidróxido de sódio diluído)	85 e 55 mg de Cellic CTec2·g <sup>-1</sup> de substrato seco	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A melhor condição foi alcançada com o menor teor de sólidos totais (5% em massa) e a maior carga de enzima. A maior concentração de açúcares fermentáveis foi obtida a 15% de sólidos totais usando a mesma carga enzimática. As fermentações foram concluídas em 9 h, rendendo 85% do rendimento teórico de etanol (16 g·L <sup>-1</sup> ) e uma produtividade volumétrica global de 2,3 g·(L·h) <sup>-1</sup> .
KUMAR <i>et al.</i> , 2018	Palha de arroz	<i>Organosolv</i>	12 FPU·g <sup>-1</sup> de Cellic CTec2	Levedura NRRL Y-50464	Uma produção de etanol de 36,7 g·L <sup>-1</sup> foi alcançada em 36 h de sacarificação a partir de uma suspensão contendo 8% de glucanas. A eficiência global de conversão de 90,1%.

DE ARAUJO GUILHERME <i>et al.</i> , 2018	Ácido, alcalino, hidrotérmico e peróxido de hidrogênio alcalino	15,0 FPU·g <sup>-1</sup> de celulose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Obeve-se 92,0% de rendimento teórico de etanol após 18 h usando o bagaço pré-tratado por tratamento ácido e alcalino, e empregando <i>S. cerevisiae</i> PE-2. Para batelada alimentada, foi usada uma carga enzimática 3X menor que a usada em batelada, obtendo-se 88% do rendimento teórico de etanol em 40 h.
MAFREDIA <i>et al.</i> , 2018	Explosão a vapor e extração alcalina	Cellic CTec2 e Cellic HTec2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ethanol Red®	Uma melhora significativa (60%) na liberação de glucose foi observada durante sacarificação usando uma combinação de celulases e hemicelulases, após pré-tratamento alcalino. A produção de etanol atingiu títulos de 4,8% (em massa) para uma conversão global de glucanas de 80%.
SCARPA <i>et al.</i> , 2019	Hidrotérmico alcalino	13,5% de sólidos totais, 288,3 unidades de endoglucanase·g <sup>-1</sup> de celulose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1	O rendimento de produção de etanol foi de 73,5%.
DIMOS <i>et al.</i> , 2019	Álcali e ácido assistidos por micro-ondas, <i>organosolv</i> e hidrotérmico, além de suas combinações	80 FPU·g <sup>-1</sup> celulose de Cellic CTec2 (Novozymes)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (fermento de pão)	A melhor produção de etanol foi obtida pela combinação sequencial de <i>organosolv</i> e pré-tratamento hidrotérmico (32,3 g·L <sup>-1</sup> , usando 15% de sólidos totais e 6 h de pré-hidrólise), com uma melhora de 32% a 50% em comparação aos outros pré-tratamentos. Estendendo o tempo de pré-hidrólise para 14 h e aumentando a concentração de substrato para 20% de sólidos totais, a produção de etanol atingiu 47,0 g·L <sup>-1</sup> (correspondente a um rendimento de etanol de 52%) após 30 h de fermentação.
DIONÍSIO <i>et al.</i> , 2021	Ácido diluído	10 FPU·g <sup>-1</sup> de sólidos totais da enzima Cellic CTec2 (Novozymes)	C5 - <i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y-27907; C6 - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1	Com base no balanço de massa, 1.000 Kg de bagaço de cana-de-açúcar produziu 191,96 Kg de etanol, o que correspondeu a 243,3 L de etanol, considerando-se a fermentação completa de pentoses e hexoses.

LIU <i>et al.</i> , 2021	Bagaço de cana-de-açúcar	Solvente eutético	25 FPU·g <sup>-1</sup> e 82 CBU·g <sup>-1</sup> (β-glucosidase) de sólidos totais	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Angel)	A melhor digestibilidade da celulose foi de 88,2%, sendo 228% superior à do bagaço não tratado. A concentração máxima de etanol foi de 16,84 g·L <sup>-1</sup> para um hidrolisado com 36,06 g·L <sup>-1</sup> de glucose e 7,36 g·L <sup>-1</sup> de xilose. A produtividade e o rendimento de etanol foram de 0,70 g·(L·h) <sup>-1</sup> e 0,42 g·g <sup>-1</sup> , respectivamente.
PERRONE <i>et al.</i> , 2021	Bagaço de cana-de-açúcar	Ozonólise e lavagem ácida	28 FPU·g <sup>-1</sup> de Cellic CTec3 (base seca)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	O pré-tratamento reduziu o teor de lignina em 25% e aumentou o rendimento de glucose em 4,8X em relação ao material não tratado. O rendimento máximo de glucose + xilose foi de 310 e 122 mg·g <sup>-1</sup> , respectivamente. O material pré-tratado produziu 3X mais etanol que o bagaço não tratado.
CHEN <i>et al.</i> , 2021	Palha de trigo	Água supercrítica	20 FPU·g <sup>-1</sup> da celulase CEL-01 + 1U·g <sup>-1</sup> da β-glucosidase SPE-007AL (base seca)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NX11424	As hemiceluloses diminuíram 18,37% após o pré-tratamento, enquanto a celulose e a lignina aumentaram 25,92% e 8,81%, respectivamente. Os rendimentos de hidrólise enzimática foram de 77,85 a 89,59% e os de fermentação, de 93,34% a 96,18%. A maior concentração de etanol foi de 37 g·L <sup>-1</sup>
BHUYAR <i>et al.</i> , 2022	<i>Amorphophallus spp.</i>	Ácido e biológico	1% de enzimas celulásicas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Após hidrólise enzimática, a concentração máxima de açúcares fermentáveis foi de 19,01 g·L <sup>-1</sup> e a de açúcares totais, em condições ótimas, de 33,22 g·L <sup>-1</sup> . O nível máximo de etanol, 8,68 g·L <sup>-1</sup> , foi produzido após 48 h de fermentação.
ZHANG <i>et al.</i> , 2023	Palha de milho	Explosão a vapor catalisada com ureia	7% de enzimas celulásicas (base seca)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	O maior rendimento de hidrólise foi de 350 mg·g <sup>-1</sup> . A taxa máxima de conversão de açúcares a etanol foi de 48,3%, com rendimento de 66,5%.
MIKULSKI e KŁOSOWSKI, 2023	Cavacos de pinho, cavacos de fajas e palha de trigo	Hidrotópico (NaCS) assistido por micro-ondas	75 FPU·mL <sup>-1</sup> de Cellic CTec2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> cepa Ethanol Red	A eficiência de hidrólise para amostras pré-tratadas foi de 55-60%. em condições otimizadas A concentração de glucose nos hidrolisados foi de 76 a 84 g·L <sup>-1</sup> . A palha de trigo gerou a maior concentração de etanol, que foi de 41,44 g·L <sup>-1</sup> .

Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentadas todas as metodologias empregadas na preparação, caracterização química, pré-tratamento e hidrólise enzimática da biomassa, bem como os respectivos insumos e equipamentos utilizados. As metodologias para as análises químicas empregadas estão de acordo com as normas adotadas pelo NREL (*National Renewable Energy Laboratory*), enquanto as metodologias para a hidrólise enzimática e explosão a vapor foram embasadas em estudos já realizados no Centro de Pesquisa em Química Aplicada da Universidade Federal do Paraná.

### 4.1 PRINCIPAIS ETAPAS DO TRABALHO

As principais etapas deste trabalho estão ilustradas na Figura 14, sendo possível observar a sequência dos principais experimentos executados para concluir os objetivos específicos propostos no item 2.2.

### 4.2 MATERIAL

Os bagaços de cana-energia e de cana-de-açúcar utilizados neste estudo foram fornecidos pela empresa Granbio (Barra de São Miguel, Alagoas, Brasil) e correspondem a produtos da safra 2019/2020. As amostras enviadas foram geradas a partir de cinco variedades de cana-energia, denominadas Vertex 2, Vertex 3, Vertex 7, Vertex 9 e Vertex 11, e uma de cana-de-açúcar (RB92579) a ser utilizada como referência. A Tabela 4 apresenta os dados de produtividade de cana variedade de cana-energia em comparação à cana referência. Os bagaços são resultantes de um processo de moagem em estação experimental para a extração de sacarose e, após a extração, foram secos e prensados. A preparação enzimática utilizada nos procedimentos de hidrólise foi a Cellic CTec3, fornecida pela empresa *Novozymes Latin America* (Araucária, Paraná, Brasil). O microrganismo empregado no ensaio de fermentação foi a preparação comercial da levedura seca *Saccharomyces cerevisiae* fornecida pela Lallemand Ethanol Technology (Milwaukee, Wisconsin, USA). Os principais reagentes utilizados foram: ácido sulfúrico (98%, Tedia), álcool etílico (95%, Êxodo), ácido acético (37% Neon), acetato de sódio (P.A., Neon) e padrões cromatográficos (Sigma). Os demais reagentes foram adquiridos na especificação exigida pelos métodos empregados.

A Tabela 4 apresenta os dados de produtividade de cada cana-energia em comparação à cana-de-açúcar utilizada como referência sob as mesmas condições experimentais. Todos os valores se referem à média dos resultados de primeiro corte, considerando a biomassa da cana integral. Esses resultados foram gerados a partir da coleta em três localidades distintas no estado de Alagoas, nos anos de 2016, 2017 e 2018, pela empresa Granbio. A pesagem da biomassa total em cada parcela (colmos, folhas e ponteiras) foi realizada para a determinação da produtividade de biomassa total de cana por área plantada em base úmida (TMVH) e base seca (TMSH). Os demais dados fornecem a quantidade de fibras (TFH) e de açúcares totais (TAH) produzida por hectare, o teor de açúcares redutores totais (ART) por tonelada de cana (base seca) e o percentual de fibras presente na biomassa produzida (Fibra%, em base seca).

Tabela 4- Dados de produtividade das variedades de cana-energia em comparação a cana-de-açúcar de referência sob mesmas condições experimentais

Cultivar	TMVH (ton·ha <sup>-1</sup> )	TMSH (ton·ha <sup>-1</sup> )	TFH (ton·ha <sup>-1</sup> )	TAH (ton·ha <sup>-1</sup> )	ART (Kg·ton <sup>-1</sup> )	Fibra (%)
RB92579	99,9	36,3	15,5	16,0	151,1	15,5
Vertex 2	206,5	73,1	46,7	15,3	73,0	22,6
RB92579	111,9	38,3	16,4	17,0	153,3	14,6
Vertex 3	121,2	42,8	23,6	13,5	112,8	19,4
RB92579	111,9	38,3	16,4	17,0	153,3	14,6
Vertex 7	126,6	49,2	31,1	11,7	94,1	24,5
RB92579	112,3	37,8	19,6	16,7	150,8	18,0
Vertex 9	151,7	53,7	43,3	8,1	55,7	28,8
RB92579	93,3	31,2	15,6	14,1	152,3	16,7
Vertex 11	140,5	52,9	36,7	13,2	96,3	26,4

Fonte: Granbio, 2023.

TMVH = toneladas de biomassa por hectare;

TMSH = toneladas de biomassa seca por hectare (fibra mais sólidos solúveis);

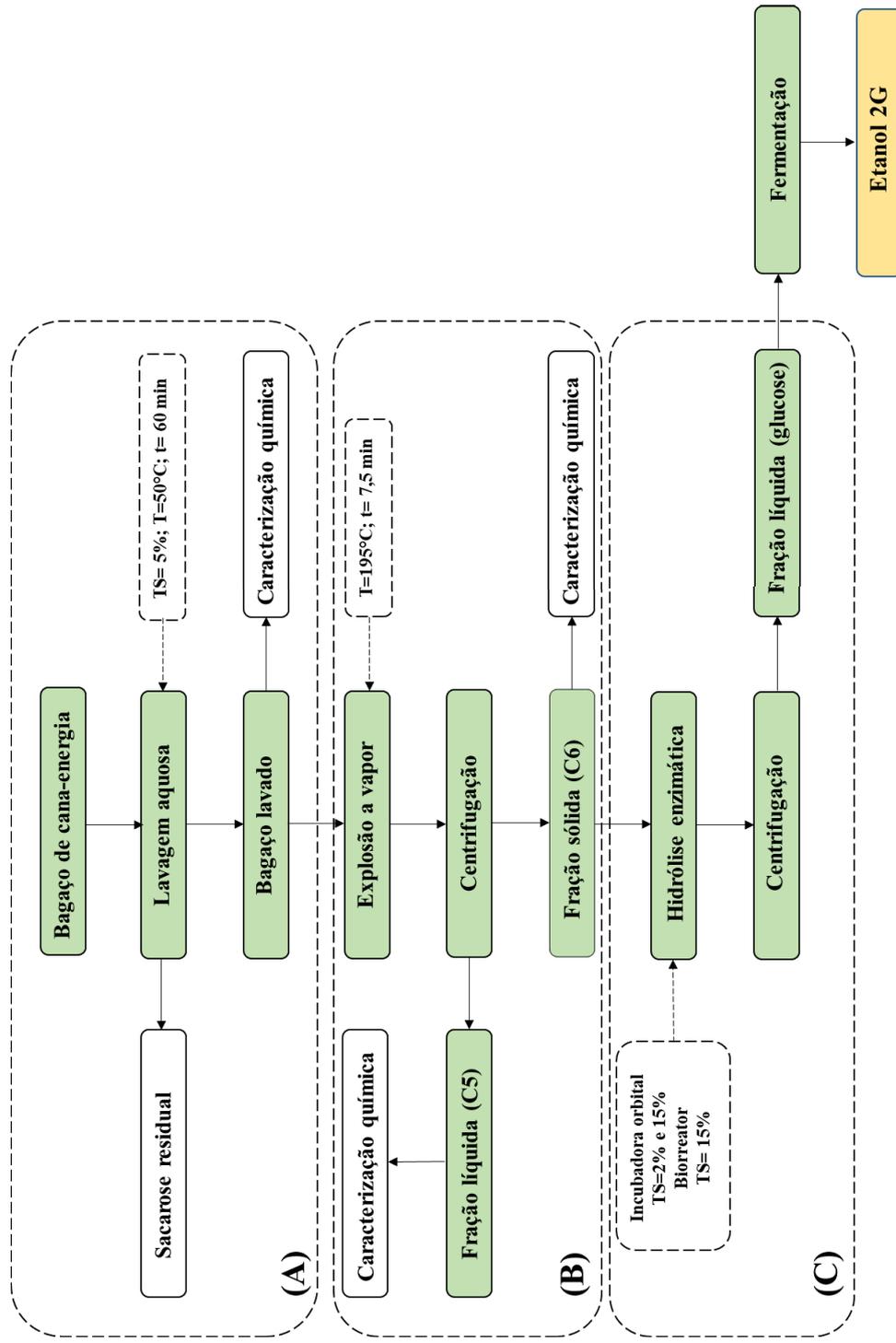
TFH = toneladas de fibra por hectare;

TAH = toneladas de açúcar por hectare;

ART (Kg·t<sup>-1</sup>) = teor de açúcares redutores totais na cana, em quilograma por tonelada de biomassa nativa;

Fibra% = teor de fibras na biomassa nativa.

Figura 14- Principais etapas do projeto proposto para a obtenção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana-energia (A) Preparo da amostra e caracterização química da biomassa (B) Pré-tratamento da biomassa (C) Hidrólise enzimática dos materiais tratados



Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

## 4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA

### 4.3.1 Lavagem do material

Para a retirada e subsequente quantificação da sacarose residual presentes nos bagaços de cana-energia ou cana-de-açúcar, as amostras foram submetidas a uma lavagem aquosa a 50°C por 1 h empregando um teor de sólidos de 5 % ( $m \cdot v^{-1}$ ). Finalizada essa etapa, alíquotas foram coletadas para quantificar o teor de sacarose residual por cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC). As amostras e padrões foram injetados em um sistema cromatográfico de íons Metrohm, modelo 850 Professional, equipado com um amostrador automático modelo 919 IC Plus e um detector de amperometria de pulso. A coluna utilizada foi a CarboPac PA100 da Dionex, que sofreu eluição gradiente (A: água, B: NaOH 130  $mmol \cdot L^{-1}$ , C: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 600  $mmol \cdot L^{-1}$ ). O fluxo total foi de 0,3  $mL \cdot min^{-1}$ , com gradiente de: até 10 min 91% A e 9% B, alteração para 90% B e 10% C, até 20 min 20% B e 80% C, alteração para 50% B 50% C, e finalizando mais 10 min na condição inicial de 91% A e 9% B.

### 4.3.1 Determinação de umidade

Dois procedimentos gravimétricos foram utilizados para a determinação do teor de umidade, sendo o primeiro por secagem em estufa a 105°C durante 4 h e o segundo por secagem em balança de infravermelho (Shimadzu, modelo MOC63u). Estas metodologias encontram-se descritas na norma NREL/TP-510-42621 proposta por Sluiter *et al.* (2008b). As análises foram realizadas em triplicata e a umidade (*TU*) pode ser calculada a partir da Equação (1).

$$TU(\%) = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

em que,  $m_i$  representa a massa do bagaço antes da secagem (g) e  $m_f$  é a massa do bagaço após a secagem (g).

### 4.3.2 Determinação de cinzas

Para a determinação do teor de cinzas, cadinhos de porcelana foram inicialmente calcinados em forno mufla a  $525 \pm 25^\circ\text{C}$  por aproximadamente 4 h. Amostras do bagaço *in natura* foram acondicionadas nos cadinhos anteriormente calcinados, sendo, em seguida, direcionados ao forno mufla e submetidos a uma rampa de aquecimento conforme descrito na norma NREL/TP-510-42622 (SLUITER *et al.*, 2005). As análises foram realizadas em triplicata e o percentual de cinzas ( $C$ ) foi calculado de acordo com a Equação (2).

$$C(\%) = \frac{m_3 - m_1}{m_2} \times 100 \quad (2)$$

em que,  $m_1$ ,  $m_2$  e  $m_3$  representam a massa do cadinho vazio, a massa seca da amostra e a massa do cadinho com as cinzas, respectivamente.

### 4.3.3 Determinação dos extrativos

Para a obtenção do teor de extrativos, cartuchos de extração foram preenchidos com aproximadamente 5 g de bagaço e submetidos a um processo de extração com água destilada e etanol 95% (vol·vol<sup>-1</sup>) em aparelho Soxhlet, conforme as recomendações da norma NREL/TP-510-42619 (SLUITER *et al.*, 2008a). Para a primeira etapa de extração, adicionou-se 190 mL de água destilada em balões de 250 mL, ao qual foram adicionadas pérolas de vidro. Os balões foram colocados em um conjunto de mantas aquecedora (Fisaton, modelo 52-6), sendo o aquecimento devidamente ajustado para fornecer 4 ciclos de solvente por hora. Após extração com água, as amostras foram secas com circulação de ar a  $40^\circ\text{C}$  e novamente sujeitas à extração utilizando etanol 95%. Ambas as extrações foram realizadas até o desaparecimento total da coloração do solvente coletado no tubo do extrator Soxhlet, sendo necessárias 10 h para água e 16 h para o etanol 95%. Ao final de cada etapa de extração, os solventes foram recuperados em evaporador rotativo (IKA, modelo RV10 digital) e teor de extraíveis ( $E$ ) foi determinado por gravimetria. A Equação (3) descreve o cálculo realizado.

$$E(\%) = \frac{m_{bf} - m_{bi}}{m_{bs}} \times 100 \quad (3)$$

em que,  $m_{bf}$  é a massa do balão contendo os extratos,  $m_{bi}$  é a massa do balão seco e tarado e  $m_{bs}$  é a massa seca da amostra de bagaço utilizada no ensaio.

#### 4.3.4 Determinação de carboidratos e lignina

A composição química do bagaço foi obtida a partir da hidrólise ácida do material, conforme a norma NREL/TP-510-42618 descrita por Sluiter *et al.* (2008). Primeiramente, pesou-se 0,30 g de bagaço moído e livre de extraíveis em um tubo de ensaio, aos quais foram adicionados 3,0 mL de ácido sulfúrico 72 % ( $m \cdot m^{-1}$ ). Os tubos de ensaio foram acondicionados em um banho a 30°C por 1 h e, a cada 5 min, as amostras foram maceradas com o auxílio de um bastão de vidro. Após 1 h, as amostras foram transferidas quantitativamente para frascos Schott utilizando 84 mL de água deionizada. A hidrólise do material foi então finalizada em autoclave por 1 h a 121°C e 1,1 bar. Os hidrolisados retirados da autoclave foram filtrados a vácuo em cadinhos de Gooch de porosidade média com papel filtro quantitativo C41 (Faixa preto, gramatura 85 g, espessura 0,20 mm e teor de cinzas 0,01%). A fração líquida obtida na filtração foi avolumada em balão de 250 mL e reservada para quantificação de carboidratos e lignina solúvel em ácido. Os sólidos retidos nos cadinhos foram lavados abundantemente com água destilada e transferidos para secagem em estufa a 105±5°C até massa constante. O teor de lignina insolúvel em ácido (LIA) foi determinado conforme a Equação (4).

$$LIA (\%) = \frac{m_{LIA} - m_c}{m_a} \times 100 \quad (4)$$

em que,  $m_{LIA}$  é a massa da lignina insolúvel em ácido,  $m_c$  é a massa de cinzas presente na lignina insolúvel em ácido e  $m_a$  é a massa inicial da amostra. Para a quantificação das cinzas presentes na lignina, as amostras foram acondicionadas em cadinhos de porcelana previamente calcinados. As amostras sofreram ignição com auxílio de bico de Bunsen para a queima do papel faixa preta, sendo, em seguida submetidas à calcinação em forno mufla conforme descrito no item 4.3.2.

A quantificação de lignina solúvel em ácido (LSA) foi realizada em espectrofotômetro UV-visível (Global Analyzer). Alíquotas do hidrolisado foram diluídas e adicionadas em cubetas de quartzo. A leitura dessa solução foi efetuada no comprimento de onda de 240 nm e a quantificação realizada de acordo com a Equação 5,

$$LSA(\%) = \frac{AxVxD}{m_a \times CP \times \epsilon} \times 100 \quad (5)$$

em que, e  $A$  é a absorvância em 240 nm,  $\epsilon$  é a absorvidade da lignina de bagaço de cana-de-açúcar nesse comprimento de onda ( $25 \text{ L} \cdot (\text{g} \cdot \text{cm})^{-1}$ ) (SLUITER *et al.* 2008),  $V$  é o volume total do filtrado,  $D$  é a diluição,  $m_a$  é a massa seca inicial da amostra e  $CP$  é o passo ótico da cubeta (1 cm).

As quantificações dos carboidratos e dos produtos de desidratação foram efetuadas empregando técnicas de HPLC. As amostras e padrões foram injetados em um sistema cromatográfico (Shimadzu, modelo LC20AD) suprido por um amostrador automático (modelo SIL10A), em desgaseificador de fase móvel (modelo DGU 14A), em forno de aquecimento de coluna (modelo CTO 10A) e detectores de índice de refração (modelo RID10A) e de rede de fotodiodos (modelo SPD-M10Avp) para quantificação de analitos por espectrofotometria no ultravioleta. A coluna utilizada foi uma Aminex HPX-87H (Bio-Rad, 300 x 7,8mm), precedida por uma pré-coluna Phenomenex Carbo-H (8,0 x 3,2mm) e eluída a 65°C com ácido sulfúrico 5 mmol·L<sup>-1</sup> a uma vazão de 0,6 mL·min<sup>-1</sup>. As amostras foram quantificadas por padronização externa com base em uma curva de calibração elaborada para os seguintes componentes com faixa de concentração: celobiose (0,05 a 0,5 mg·mL<sup>-1</sup>), glucose (0,2 a 2,3 mg·mL<sup>-1</sup>), arabinose (0,05 a 0,5 mg·mL<sup>-1</sup>), xilose (0,15 a 1,5 mg·mL<sup>-1</sup>), ácido acético (0,15 a 1,5 mg·mL<sup>-1</sup>), furfural e 5-hidroxi metilfurfural (0,05 a 1,5 mg·mL<sup>-1</sup>).

#### 4.4 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A explosão a vapor foi realizada sob condições reacionais pré-otimizadas por Pitarello *et al.* (2016). Anteriormente à realização dos ensaios, foram efetuadas explosões apenas com a injeção de vapor (sem amostra), com o objetivo de condicionar o sistema. Os ensaios foram executados a 195°C por 7,5 min (fator de severidade de 3,76) em um reator de aço inox com capacidade de 10 L, equipado com sensores para controle de temperatura e pressão (Figura 15). O reator está vinculado a uma caldeira de alta pressão, um compressor de ar e um ciclone, que foi empregado para a descarga do material. A alimentação do reator foi efetuada de forma manual com aproximadamente 1 Kg de bagaço contendo 50% de umidade. Após alimentação do reator, a válvula de entrada de vapor foi aberta e o tempo de pré-tratamento foi cronometrado após a temperatura desejada ser atingida. Ao término do tempo de pré-tratamento, a entrada de vapor foi fechada e, em seguida, acionou-se a abertura da válvula

inferior, permitindo a descompressão do material. O material foi arrastado para o interior de um ciclone e condicionado em um vaso coletor. A cada batelada, duas explosões foram realizadas com apenas a injeção de vapor antes de efetuar a retirada do material do vaso coletor. Essa etapa foi realizada com a finalidade de garantir a recuperação do material residual. Após a despressurização, as amostras foram coletadas e seguiram para as etapas de lavagem e centrifugação. Foram realizadas 3 lavagens em temperatura ambiente a um teor de sólidos totais de 5% ( $m \cdot v^{-1}$ ) por 15 min com agitação mecânica. Alíquotas da fração líquida de todas as lavagens foram armazenadas e submetidas à análise cromatográfica (vide abaixo) e quantificação de sólidos dissolvidos de acordo com a norma NREL/TP-510-42621 (SLUITER *et al.*, 2008) A fração sólida recuperada na última centrifugação foi armazenada sob vácuo e refrigeração para posterior análise composicional e hidrólise enzimática. O rendimento mássico ( $Rm$ ) foi calculado a partir da relação entre as massas recuperadas da fração sólida e líquida conforme descrito na Equação (6).

$$Rm = \frac{m_S + m_L}{m_I} \times 100 \quad (6)$$

em que,  $m_S$  é massa da fração sólida,  $m_L$  massa da fração líquida e  $m_I$  massa inicial do bagaço.

Figura 15- Instalações do reator de explosão a vapor no NPDEAS (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável) da Universidade Federal do Paraná

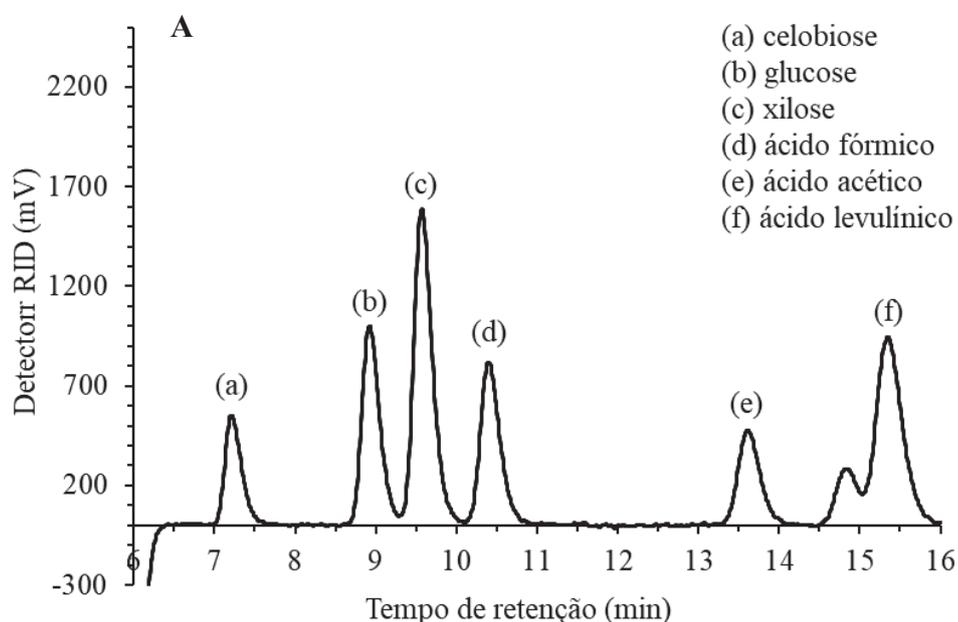


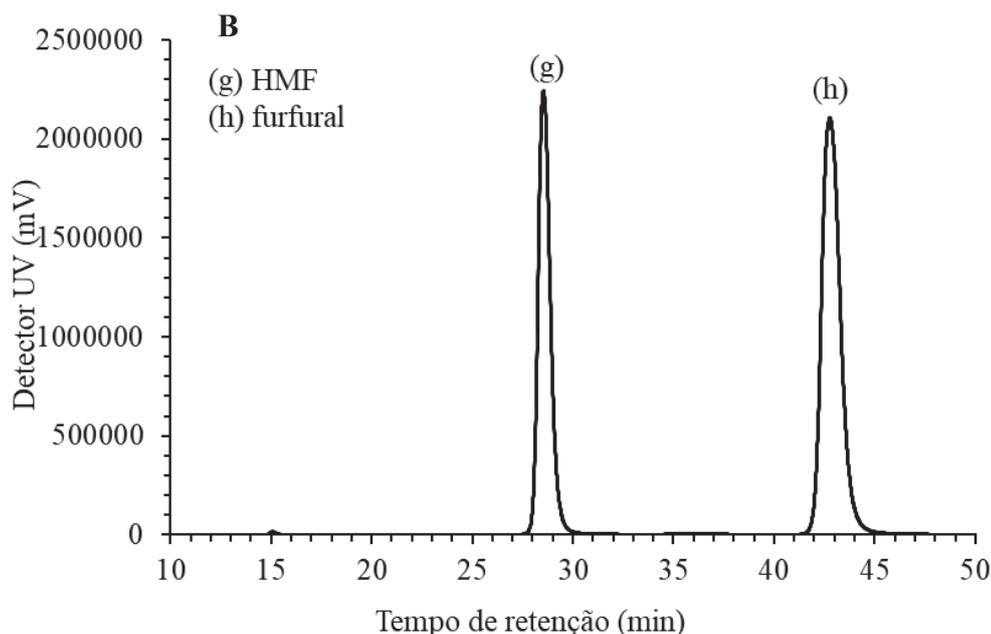
Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS

O sistema cromatográfico descrito no item 4.2.5 foi utilizado para determinação da composição química das frações solúveis em água, obtidas após a explosão a vapor e lavagem dos substratos pré-tratados. Para quantificação dos carboidratos presentes na fração solúvel, que são majoritariamente provindos das hemiceluloses, realizou-se uma reação de pós-hidrólise seguindo a norma NREL/TP-510-42623 proposta por Sluiter *et al.* (2008c). A pós-hidrólise converte oligossacarídeos em monossacarídeos e sua quantificação pode então ser determinada por padronização externa a partir de curvas de calibração para compostos como celobiose, glucose, xilose e arabinose. Além dos monossacarídeos, foram monitorados os produtos de desidratação HMF, furfural, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico. A Figura 16 apresenta os componentes monitorados durante análise da fração solúvel em diferentes detectores.

Figura 16- Componentes monitorados por cromatografia a líquido na fração solúvel obtida após pré-tratamento a vapor, empregando os detectores (A) de índice de refração e (B) de absorção no ultravioleta





Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Devido à falta de resolução dos oligossacarídeos no sistema cromatográfico descrito no item 4.3.4, para avaliar as frações de oligossacarídeos liberados durante o pré-tratamento a fração solúvel foi injetada no sistema cromatográfico apresentado no item 4.3.1. A coluna sofreu eluição gradiente das seguintes fases móveis (A: água; B: NaOH  $130 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; C:  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$   $600 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  em NaOH  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) como descrito por Alyassin *et al.* (2020). O fluxo total foi de  $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ . O programa de eluição foi de: até 10 min 91% A e 9% B, alteração para 90% B e 10% C, até 20 min 20% B e 80% C, alteração para 50% B 50% C, até 40 min 100% de B e finalizando mais 10 min na condição inicial de 91% A e 9% B.

A caracterização da fração insolúvel também foi quantificada de acordo com o item 4.2.5 com a hidrólise ácida do material. Dessa forma, foi obtida a recuperação dos principais constituintes presentes no material tratado em relação ao original para a realização do balanço mássico após explosão.

#### 4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A acessibilidade dos substratos pré-tratados foi avaliada de acordo com a norma NREL/TP-5100-63351 descrita por Resch *et al.* (2015). Os ensaios foram realizados a 2% de sólidos totais com 30 mg enzima Cellic CTec3 por grama de material seco (atividade enzimática de  $5,55 \text{ FPU}\cdot\text{g}^{-1}\text{material}$ ) em tampão acetato de sódio  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 5,2. As

reações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL em uma incubadora de agitação orbital (Infors, modelo Ecotron) por 168h a 50°C e 150 rpm. Para monitorar a liberação dos carboidratos hidrossolúveis no hidrolisado, alíquotas foram coletadas nos tempos de 3, 6, 9, 24, 48, 72, 96 e 168h e analisadas usando o sistema cromatográfico citado no item 4.3.4. Os componentes monitorados por padronização externa foram celobiose, glucose e xilose. Estes valores foram expressos em relação aos seus polissacarídeos de origem e os rendimentos de hidrólise foram então calculados em relação à celulose presente no bagaço pré-tratado (7). Analogamente ao método descrito, realizou-se uma hidrólise com teor de sólidos igual a 15% com carga enzimática de 60 mg·g<sup>-1</sup> material seco (atividade enzimática de 11,1 FPU·g<sup>-1</sup> material), com isso foi possível analisar a acessibilidade dos materiais para baixo e alto teor de sólidos Equação (7).

$$GlcEq (\%) = \frac{C_{cel} \times 1,05 \times C_{Glc} \times 0,9}{AnGlc_i} \times 100 \quad (7)$$

em que, *GlcEq* representa equivalente de glucose, *C<sub>cel</sub>* representa concentração de celobiose *C<sub>Glc</sub>* é a concentração de glucose, *AnGlc<sub>i</sub>* é a anidrogucose determinada no material.

#### 4.6.1 Hidrólise enzimática em biorreator

Após a avaliação da acessibilidade enzimática dos materiais pré-tratados. A hidrólise foi submetida a um aumento na escala. Os ensaios foram realizados em um biorreator de bancada Labfors 5-HT BioEtOH (Infors) a 15% de sólidos totais com 60 mg enzima Cellic CTec3 por grama de material seco (atividade enzimática de 11,1 FPU·g<sup>-1</sup> material) em tampão acetato de sódio 50 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 5,2 por 72h. O controle de temperatura se deu por recirculação de água na parte externa da cuba encamisada e a agitação foi realizada com um sistema do tipo turbina de pás planas. Vale ressaltar que o biorreator é equipado com sensor de pH. A Figura 17A demonstra o biorreator utilizado.

### 4.7 FERMENTAÇÃO

#### 4.7.1 Preparação do meio de cultura

O meio de cultura utilizado para o crescimento da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*- CAT1) foi preparado conforme descrito por Bazoti, *et al.*, (2017). O meio

designado de YPD, cuja composição é 10 g·L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 20 g·L<sup>-1</sup> de peptona e 20 g·L<sup>-1</sup> de glucose foi esterilizado via autoclave durante 20 min a 121°C e 1,1 bar. Após esterilização o meio de cultura foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 250 mL e a levedura adicionada. Posteriormente, o frasco foi vedado com tampão de algodão e submetido à agitação em uma incubadora orbital (Infors, modelo Ecotron) por 24h a 30°C e 150 rpm para multiplicação. Toda a manipulação do material utilizado nos ensaios foi realizada em uma câmara de fluxo laminar que teve suas superfícies esterilizadas com álcool etílico 70°GL e radiação ultravioleta por 30 min, antes de iniciar a incubação.

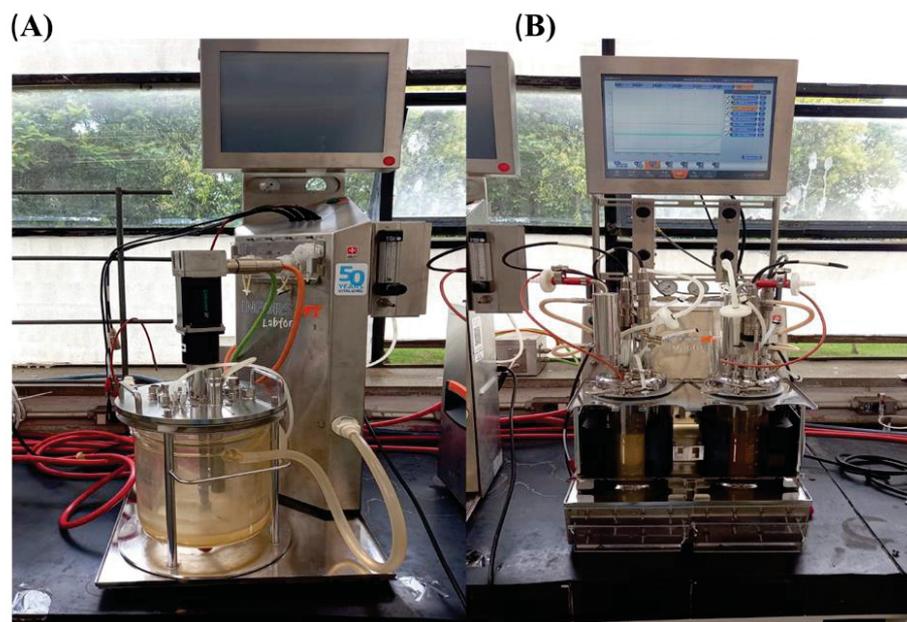
#### 4.7.2 Ensaios de fermentação em biorreator

Para a fermentação foram utilizados hidrolisados obtidos após sacarificação em biorreator com descrito no item 4.6 . A fermentação foi conduzida em um biorreator paralelo Multifors 2 (Figura 17) com volume útil de 300 mL a 30°C e 100 rpm por 24h. O biorreator possui medidores online de O<sub>2</sub>, pH e conta com sistema de agitação tipo turbina de pás planas. Os hidrolisados foram suplementados com extrato de levedura 10 g·L<sup>-1</sup> e autoclavado juntamente com o leitor de pH e a cuba de vidro do reator através de vapor saturado a 121°C por 20 min. Após esfriar, o inóculo foi vertido no reator, utilizando uma concentração de aproximadamente 10% do volume total do meio reacional. Todos os ensaios foram realizados simultaneamente com a fermentação de uma solução controle de glucose de concentração equivalente ao hidrolisado fermentado. Ressalta-se que todos os materiais utilizados nesta etapa foram esterilizados previamente em autoclave. O rendimento das fermentações foi calculado através da Equação (8),

$$E_f(\%) = \frac{[EtOH_f]}{[Glc_i \times 0,51]} \times 100 \quad (8)$$

onde  $E_f(\%)$  é a eficiência de fermentação,  $[Glc_i]$  é a concentração de glucose inicial,  $[EtOH_f]$  é a concentração de etanol final. A quantificação foi realizada no sistema cromatográfico descrito no item 4.3.4, onde foram monitorados os seguintes componentes: glucose (0,2 a 2,3 mg·mL<sup>-1</sup>), etanol (0,3 a 3 mg·mL<sup>-1</sup>), ácido acético (0,15 a 1,5 mg·mL<sup>-1</sup>), ácido fórmico (0,05 a 1,5 mg·mL<sup>-1</sup>).

Figura 17- (A) Biorreator de bancada utilizado nos ensaios de hidrólise (B) Biorreator utilizado para os ensaios de fermentação



Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

#### 4.8 EXTRAÇÃO DA LIGNINA

Para avaliar a extratibilidade da lignina presente no material pré-tratado, as amostras foram submetidas a extração exaustiva com etanol em aparelho Soxhlet, como descrito no item 4.3.3. As extrações foram realizadas até o desaparecimento total da coloração do solvente coletado no tubo do extrator Soxhlet, sendo necessário 10 h. Ao final da extração, os solventes foram recuperados em evaporador rotativo (IKA, modelo RV10 digital) e rendimento da lignina extraída ( $L_E$ ) foi determinado por gravimetria. A Equação (9) descreve o cálculo realizado.

$$L_E(\%) = \frac{m_{bf} - m_{bi}}{m_{bs}} \times 100 \quad (9)$$

em que,  $m_{bf}$  é a massa do balão contendo os extratos,  $m_{bi}$  é a massa do balão seco e tarado e  $m_{bs}$  é a massa seca da amostra de bagaço utilizada no ensaio.

### 4.8.1 Análise da lignina extraída

As amostras de lignina extraídas foram submetidas a análise por FTIR (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier). Os ensaios foram realizados em espectrofotômetro (Bruker, modelo Vertex 70), disponível no Laboratório Multiusuário de Espectrometria no Infravermelho da UFPR (Curitiba, Brasil). Para a análise, pastilhas de KBr foram preparadas contendo amostras na concentração de 1% ( $m \cdot m^{-1}$ ). Os espectros foram coletados no modo transmitância, com resolução de  $1 \text{ cm}^{-1}$  e 64 varreduras.

Os espectros de FTIR obtidos para as ligninas extraídas com etanol foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA). Para isso, uma matriz matemática de igual número de linhas foi compilada com a leitura de cada frequência de infravermelho presente no espectro das amostras, cujos dados foram posicionados em diferentes colunas. Então, essa matriz foi analisada por correlação matricial com o pacote “psych” no programa Rstudio, com o comando de pareamento de painel. O gráfico de correlação de componente principal foi realizado com o comando de gráfico de PCA do pacote “ggbiplot”.

## 4.9 TESTE DE TUKEY

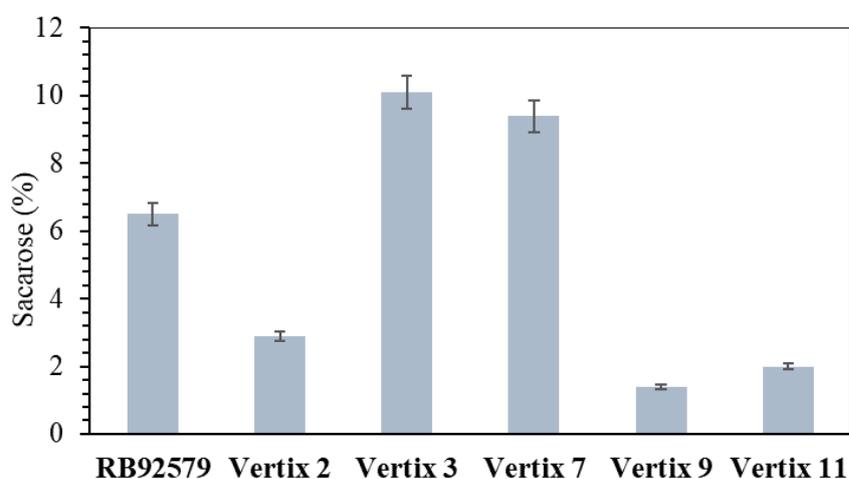
A análise de Tukey foi realizada com o pacote básico de análises do *software R*, com um intervalo de confiança de 95%. Conhecido como teste de diferença significativa honesta (HSD) realiza uma comparação múltipla em uma etapa. O teste compara as médias de cada fator de forma pareada, e identifica as diferenças entre duas médias que sejam maiores que o erro padrão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 LAVAGEM DAS AMOSTRAS

Antes de iniciar as etapas de caracterização química e de pré-tratamento, as amostras de bagaço foram submetidas a uma lavagem aquosa com o intuito de retirar a sacarose residual decorrente da etapa de extração do caldo. A Figura 18 apresenta o teor de sacarose quantificado após a lavagem.

Figura 18 - Teor de sacarose obtido nas amostras após lavagem aquosa



Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

As amostras RB92579, Vertix 3 e Vertix 7 apresentaram os maiores teores de sacarose residual e sua presença em altas concentrações afeta diretamente o balanço mássico realizado a partir do processo de pré-tratamento. Um alto teor de extrativos acarreta a diminuição do teor relativo de outros componentes da biomassa e, como resultado, a composição química da amostra se torna equivocada. Já durante o pré-tratamento, esse dissacarídeo pode ocasionar a formação de produtos da desidratação, como HMF e seus derivados (ácido fórmico e ácido levulínico), que atuam como inibidores do processo de bioconversão. Além disso, dependendo da severidade das condições operacionais, esses produtos podem sofrer reações de condensação formando as huminas (estruturas aromáticas macromoleculares) que, por serem insolúveis em água, podem ser contabilizadas equivocadamente como lignina, comprometendo a composição química das amostras após a etapa de pré-tratamento.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

O conhecimento da composição química da biomassa lignocelulósica é de extrema importância para a compreensão de suas propriedades e aplicação correta em processos de transformação química, bem como na produção de etanol celulósico. Isto posto, realizou-se a caracterização química dos bagaços e os valores médios estão discriminados na Tabela 5. O teor de cinzas e de extrativos foram obtidos a partir de amostras do bagaço *in natura* (após lavagem), enquanto os percentuais de carboidratos e lignina foram quantificados a partir do material livre de extrativos. A remoção de extrativos tem como finalidade principal eliminar o material não estrutural para que não haja interferências analíticas na quantificação dos demais componentes (SLUITER *et al.*, 2008). Todos os resultados foram calculados com base em massa seca e derivam de experimentos realizados em triplicata.

Tabela 5- Composição química dos bagaços de cana-energia e cana-de-açúcar

Componentes	Percentual (%)					
	RB92579	Vertex 2	Vertex 3	Vertex 7	Vertex 9	Vertex 11
Anidrogucose em glucanas	38,5±0,3	39,0±1,0	37,1±0,7	38,5±0,6	39,0±0,4	40,2±0,1
Anidroxilose em xilanas	18,0±0,2	17,8±0,5	18,4±0,6	19±0,5	18,0±0,5	17,7±0,7
Anidroarabinose em xilanas	1,3±0,3	1,8±0,1	1,7±0,3	0,9±0,4	1,8±0,1	1,9±0,2
Grupo acetila	2,9±0,9	2,9±0,5	3,3±0,5	2,7±0,9	2,1±0,2	2,6±0,4
Lignina insolúvel em ácido	16,5±0,6	20,8±0,8	21,6±0,7	17,6±0,7	20,4±0,4	20,4±1,0
Lignina solúvel em ácido	4,8±0,7	5,4±0,1	4,4±0,5	4,5±0,3	6,0±1,0	5,7±0,7
Extraíveis totais	8,1±0,4	5,8±0,7	4,3±0,4	6,9±0,6	5,6±0,4	5,2±0,5
Água	5,5±0,5	3,2±0,6	1,9±0,3	4,1±0,8	2,6±0,3	2,6±0,5
Etanol	2,6±0,2	2,6±0,4	2,4±0,6	2,8±0,2	3,0±0,4	2,6±0,1
Cinzas	3,3±0,1	2,1±0,1	1,8±0,1	2±0,2	1,9±0,2	1,4±0,1
<b>Total</b>	<b>93,3</b>	<b>94,8</b>	<b>93,6</b>	<b>95,4</b>	<b>95,1</b>	<b>95,1</b>

Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

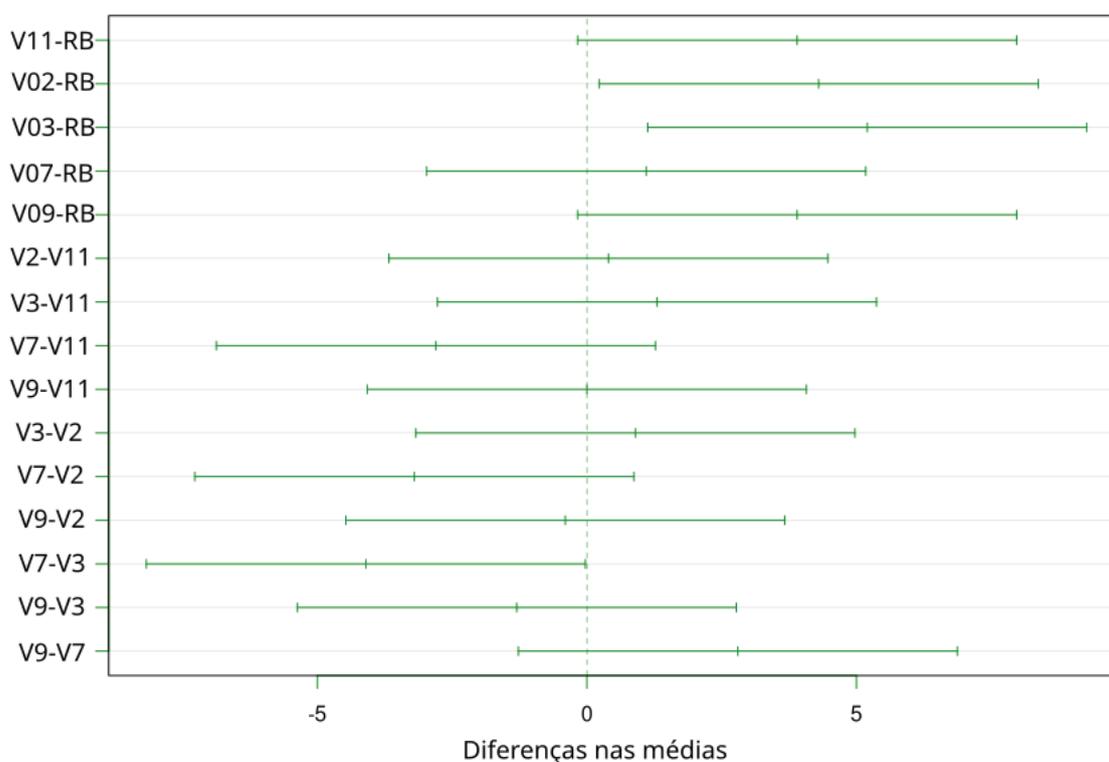
Analisando a Tabela 5, nota-se que a somatório dos componentes está entre 93 e 96% aproximadamente. Isso porque alguns compostos presentes no material não foram quantificados, como os ácidos urônicos e as proteínas. Além disso, não se pode descartar possíveis imprecisões na determinação de parâmetros como o teor de umidade. Os resultados obtidos para amostra controle (RB92579) foram comparados com os apresentados por Fontes *et al.* (2021), que encontraram 63,3% de carboidratos (40% de glucanas, 23,6% de xilanas contendo 1,6% de resíduos de arabinosil), 21% de lignina total (com apenas 0,02% de lignina

solúvel em ácido), 4,2% de extraíveis totais e 2,8% de cinzas. Esses resultados mostram uma diferença no teor de carboidratos de 5,5% em relação aos valores dispostos na Tabela 5. Embora o teor de lignina total não tenha apresentado diferença significativa, o teor de lignina solúvel em ácido da RB92579 foi consideravelmente superior (4,8%). Já o valor de extrativos foi praticamente o dobro do apresentado por Fontes *et al.* (2021), enquanto as cinzas não apresentaram diferenças significativas. Com a lavagem aquosa do material, esperava-se uma diminuição percentual significativa no teor de extrativos em água, porém, os resultados sugerem a presença de outros componentes hidrossolúveis além da sacarose. Em relação à composição química das variedades de cana-energia, os valores foram comparados com os obtidos por Thammasittirong *et al.* (2017). Os autores apresentaram em seu estudo a caracterização química de quatro clones de cana-energia. Para a quantificação do teor de celulose, os autores consideram as concentrações obtidas em sistema cromatográfico para os componentes glucose, celobiose e HMF, enquanto para as concentrações de hemicelulose foram considerados xilose, arabinose, ácido acético e furfural. Foram obtidos teores de celulose, hemiceluloses, lignina e outros componentes (extrativos e cinzas) na faixa de 40,0-45,7%, 25,4-30,1%, 12,0-17,5% e 11,6-15,8%, respectivamente. Esses valores são relativamente superiores (~16%) aos obtidos no presente trabalho em relação ao percentual médio de carboidratos (celulose e hemiceluloses) das amostras de cana-energia, enquanto o percentual médio de lignina é aproximadamente 40% inferior. Segundo Szczerbowski *et al.* (2014) a dispersão de dados de análise composicional relatados na literatura pode ser justificada pela forma que os valores são apresentados ou devido aos métodos experimentais aplicados. A extensão da remoção de extrativos, quantificação adequada de componentes menores, comprimento de onda utilizado para determinação de lignina solúvel em ácido, resolução da coluna cromatográfica e aplicação de fatores de hidrólise para contabilizar as perdas de açúcar devido à desidratação são alguns dos principais fatores que influenciam na composição química de biomassas lignocelulósicas. Além disso, vale salientar que a análise composicional está diretamente condicionada à localização geográfica, material genético e clima da região onde as plantas são cultivadas; portanto, diferenças percentuais entre os componentes da biomassa poderão ser observadas (BHATIA *et al.*, 2020; FRANCO *et al.*, 2013).

Ao comparar a amostra controle (RB92579) com as amostras de cana-energia, percebe-se que o teor de glucanas (anidrogucose) não apresentou grande variação, sendo o menor percentual obtido para a Vertix 3 (37,1%) e o maior para a Vertix 11 (40,2%). Os teores de hemiceluloses, representados pela somatória de anidroxilose e anidroarabinose, foram

similares entre as diferentes amostras com exceção da Vertex 7, que apresentou percentual de arabinose (0,9%) inferior às demais. Com relação à lignina insolúvel em ácido, houve uma diferença importante entre a Vertex 3 (21,6%) e a RB92579 (16,5%). Isso posto, o teste de Tukey foi empregado com o auxílio do *software R* para se estabelecer uma comparação estatística entre as médias dos componentes apresentados na Tabela 5. Os resultados encontrados confirmaram que houve diferença significativa apenas entre os teores de lignina insolúvel do bagaço Vertex 3 e do bagaço referencial RB92579 (Figura 19). Vale ressaltar que o teste de Tukey avalia as diferenças das médias em relação ao desvio das medidas. Assim, o eixo x da Figura 19 caracteriza a diferença das médias, enquanto o eixo y fornece o pareamento comparativo. A diferença estatística é considerada existente quando a barra de comparação se encontra fora da linha tracejada (marco zero); por outro lado, quando as médias são semelhantes, a barra toca ou insere a mesma. Por isto, a comparação da amostra Vertex 3 com a amostra de referência foi a única situação em que alguma diferença significativa foi constatada. Os resultados do teste estatístico para os demais componentes das amostras encontram-se registrados no Anexo A.

Figura 19- Teste de Tukey para os teores médios de lignina insolúvel das amostras



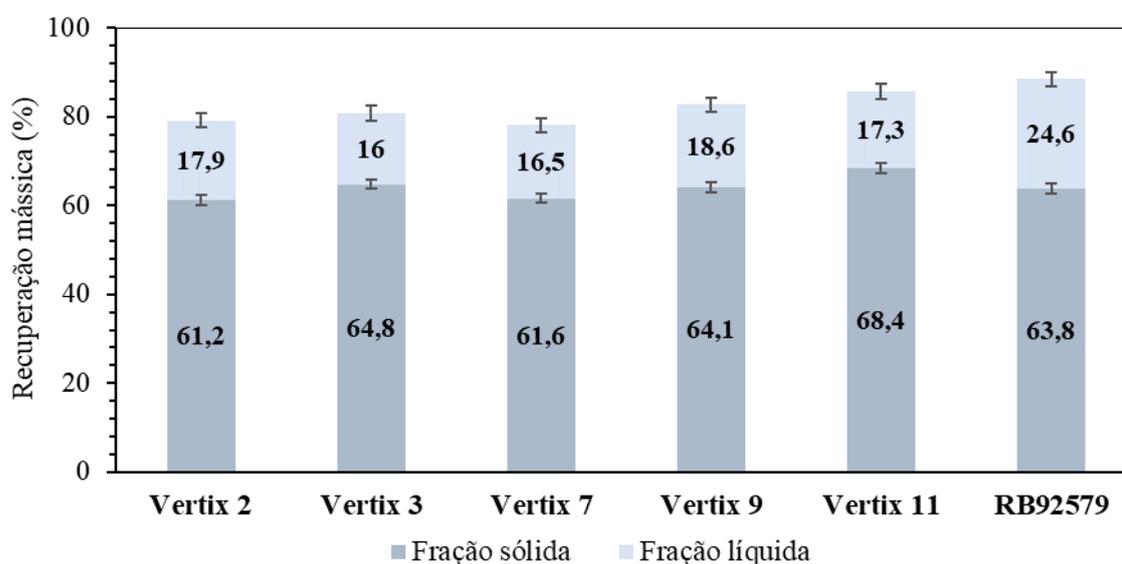
Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

A Figura 19 indica que maioria dos valores obtidos nessa análise estão condizentes com a composição do bagaço referencial (RB92579). Um resultado semelhante foi observado por Fanelli *et al.* (2020), que analisaram o conteúdo da biomassa e a composição química de dois clones de cana-energia e de um de seus progenitores (cana ancestral) em diferentes estágios de desenvolvimento dos entrenós. Foi constatado que embora as três culturas tenham diferenças entre os teores de fibra, teor de sacarose e morfologia, sua composição geral de biomassa (lignina, hemiceluloses e celulose) foi semelhante.

### 5.3 EXPLOSÃO A VAPOR

A explosão a vapor foi realizada em condições operacionais previamente otimizadas para recuperação máxima de glucanas na fibra e hemiceluloses na fração líquida (Pitarelo *et al.*, 2016). O pré-tratamento ocorreu em condições de auto-hidrólise, ou seja, sem adição de catalisadores exógenos. A Figura 20 apresenta os valores médios (triplicatas) das recuperações mássicas obtidas após o pré-tratamento.

Figura 20- Recuperação mássica das amostras após pré-tratamento por explosão a vapor realizado a 195°C e 7,5 min



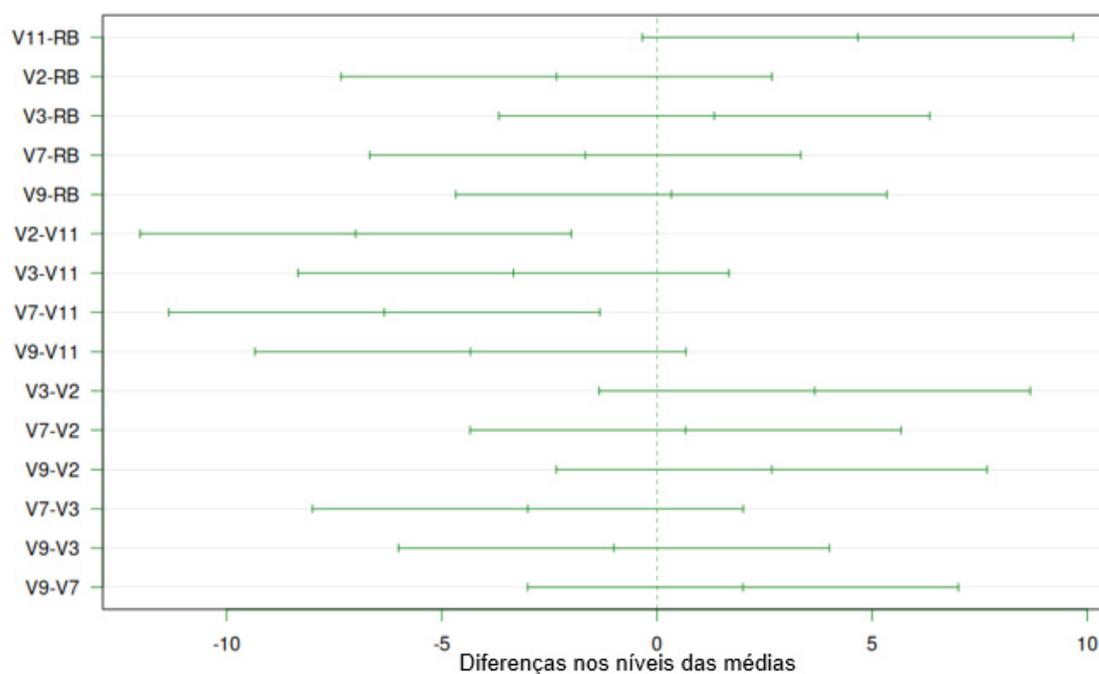
Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Nos experimentos de explosão a vapor, o maior rendimento de recuperação em relação à massa seca do bagaço, de 88,6%, foi obtido para a amostra RB92579, que correspondeu a 63,8% de fração sólida e 24,8% de fração líquida. Considerando apenas a fração sólida fibrosa, a amostra com melhor recuperação mássica foi a Vertix 11, que ficou 4 pontos percentuais

acima da amostra de referência (RB92579). Já a menor recuperação mássica total foi de 78,1% para o bagaço da amostra Vertex 7. Pitarelo *et al.* (2016) conseguiram, em ensaios de auto-hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, recuperar 18,0% de fração líquida e 79,3% de fração sólida. Variações nos valores de rendimento obtidos podem ser justificadas pela formação e perda de compostos furânicos e de ácidos orgânicos que são volatilizados durante a etapa de descompressão do reator, além de perdas mássicas intrínsecas ao procedimento experimental. Para certificar que as diferenças apontadas entre os valores de recuperação mássica de cada fração foram significativas, aplicou-se o teste de Tukey.

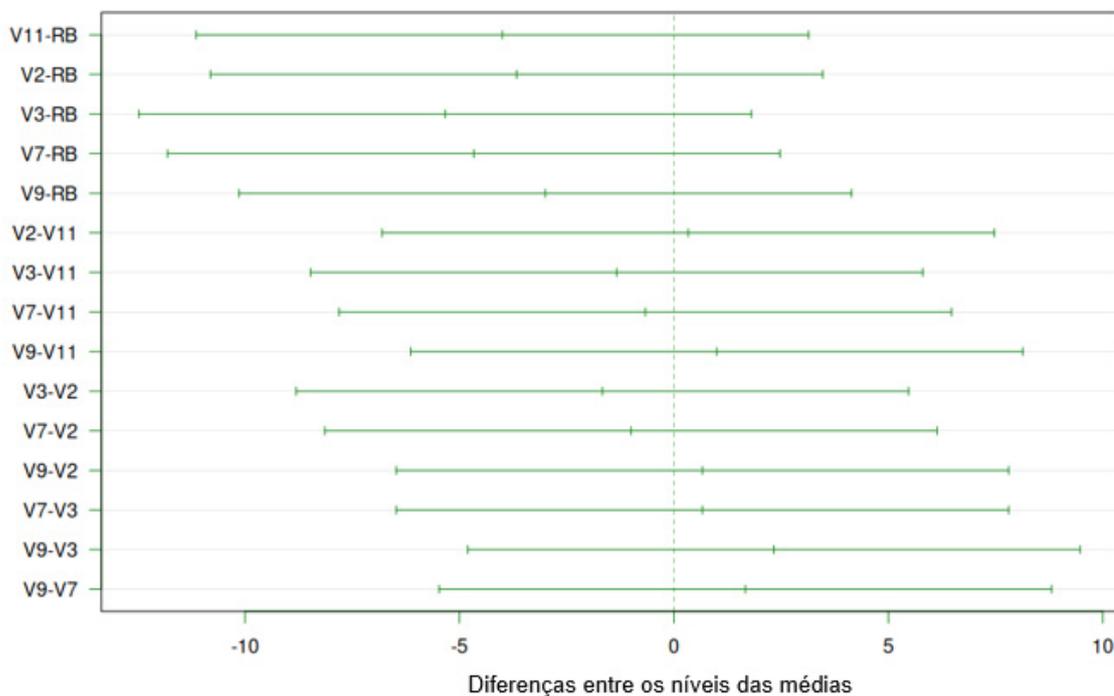
As Figura 21 e Figura 22 apresentam os resultados encontrados para a recuperação mássica das frações sólida e líquida, respectivamente. Como resultado, percebe-se que as médias percentuais de recuperação da fração sólida apresentaram diferença estatística para a amostra Vertex 11 com relação as amostras Vertex 2 e Vertex 7. Já para a fração líquida, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, não sendo possível definir ou indicar qual amostra teria permitido uma maior recuperação após o pré-tratamento.

Figura 21- Teste de Tukey para a recuperação da fração sólida fibrosa gerada a partir da explosão a vapor de cana-energia e de cana-de-açúcar



Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Figura 22- Teste de Tukey para a recuperação da fração líquida gerada a partir da explosão a vapor de cana-energia e de cana-de-açúcar



Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

### 5.3.1 Composição química das frações sólida e líquida após a explosão a vapor

As frações sólidas obtidas após explosão a vapor foram caracterizadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.5 e os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6- Composição química da fração sólida após pré-tratamento a vapor

Componentes	Percentual (%)					
	RB92579	Vertex 2	Vertex 3	Vertex 7	Vertex 9	Vertex 11
Anidroglicose em glucanas	62,2±1,3	60,2±0,5	58,8±1,1	63,1±0,9	59,5±1,0	61,7±1,3
Anidroxilose em xilanas	4,0±0,4	2,5±0,3	2,6±0,1	2,6±0,5	3,2±0,1	2,8±0,1
Grupo acetil em xilanas	1,0±0,1	1,0±0,4	ald*	0,9±0,1	0,9±0,1	Ald
Pentoses desidratadas	0,4±0,1	0,2±0,1	Ald	0,3±0,1	0,4 ± 0,1	Ald
Lignina total	27,8±1,5	32,9±1,3	36,0±1,7	31,9±1,4	32,2±1,0	32,9±1,2
Solúvel em ácido	3,9±0,7	3,2±0,3	2,6±0,5	3,8±0,5	3,7±0,6	2,3±0,3
Insolúvel em ácido	23,9±0,7	29,7±0,8	33,4±1,1	28,1±0,9	28,6±0,4	30,6±0,7
Cinzas	2,1±0,3	1,4±0,1	0,9±0,1	1,0±0,1	0,5±0,2	0,6±0,1
<b>Total</b>	<b>97,5</b>	<b>98,2</b>	<b>98,3</b>	<b>99,8</b>	<b>96,8</b>	<b>98,0</b>

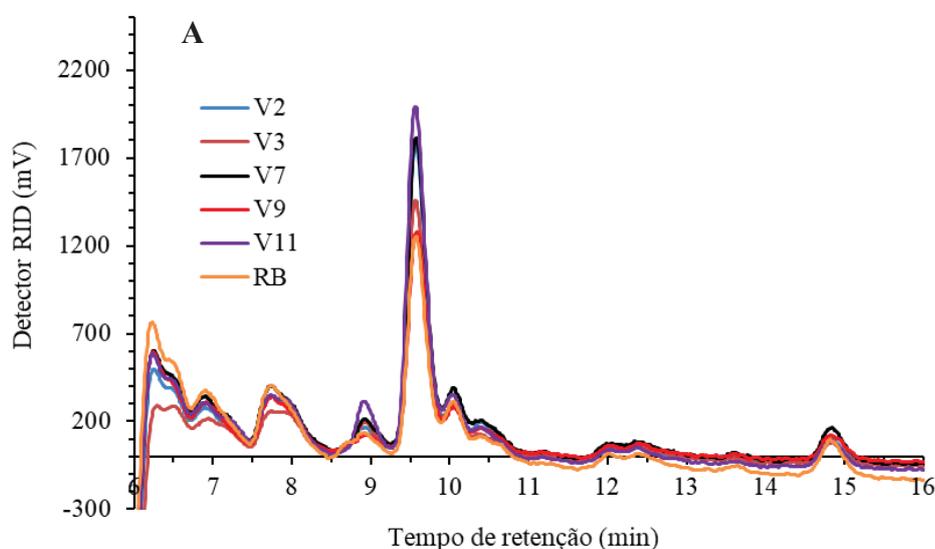
\* Abaixo do limite de detecção.

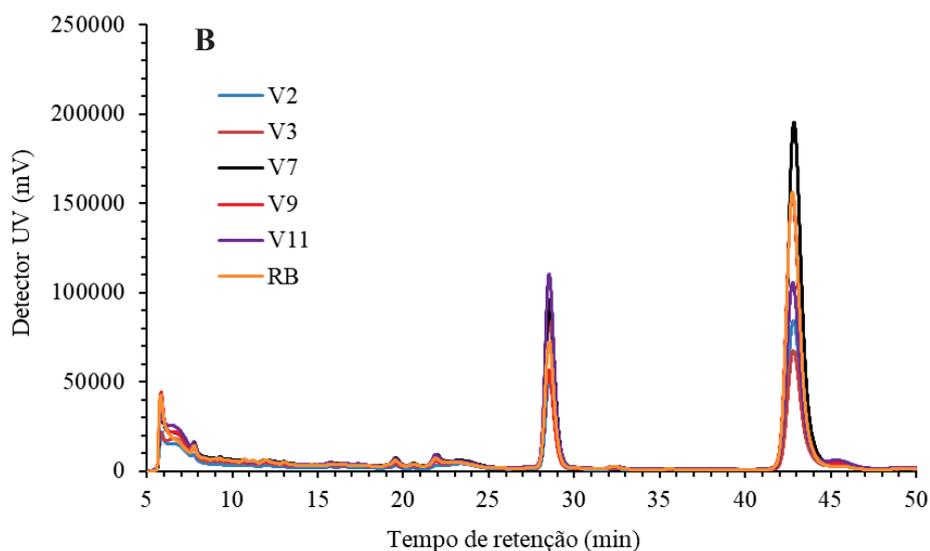
Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

A caracterização química das amostras demonstra um aumento no teor de anidroglicose e de lignina em relação ao material original (Tabela 5). Esse aumento ocorre principalmente pela hidrólise das hemiceluloses durante o pré-tratamento. Além disso, a Tabela 6 indica a presença de compostos furânicos como o furfural nos hidrolisados ácidos das amostras RB92579, Vertex 2, Vertex 7 e Vertex 9. Este composto foi contabilizado como produto da desidratação de pentoses, mas sua origem é incerta, uma vez a desidratação de pentoses pode ser decorrente de xilose ou arabinose, principais açúcares presentes nas hemiceluloses (BAZOTI *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2011).

A composição química das frações líquidas derivadas do pré-tratamento foi determinada por cromatografia de fase líquida. Em todos os ensaios, foram monitoradas as recuperações de carboidratos, compostos furânicos e ácidos orgânicos. As análises cromatográficas destas frações líquidas estão dispostas na Figura 23. A Figura 23A mostra que a explosão a vapor produziu hidrolisados com uma grande quantidade de oligômeros, com tempos de retenção entre 6,0 e 7,5 min. Isto demonstra a ocorrência de hidrólise parcial das hemiceluloses durante o pré-tratamento, conforme já demonstrado por outros autores (RAMOS 2003; ALVIRA *et al.*, 2010). Para avaliar o grau de despolimerização das hemiceluloses a partir da formação de xilo-oligossacarídeos (XOs) durante o pré-tratamento, a fração solúvel foi submetida à reanálise por cromatografia aniônica conforme apresentado na Figura 24.

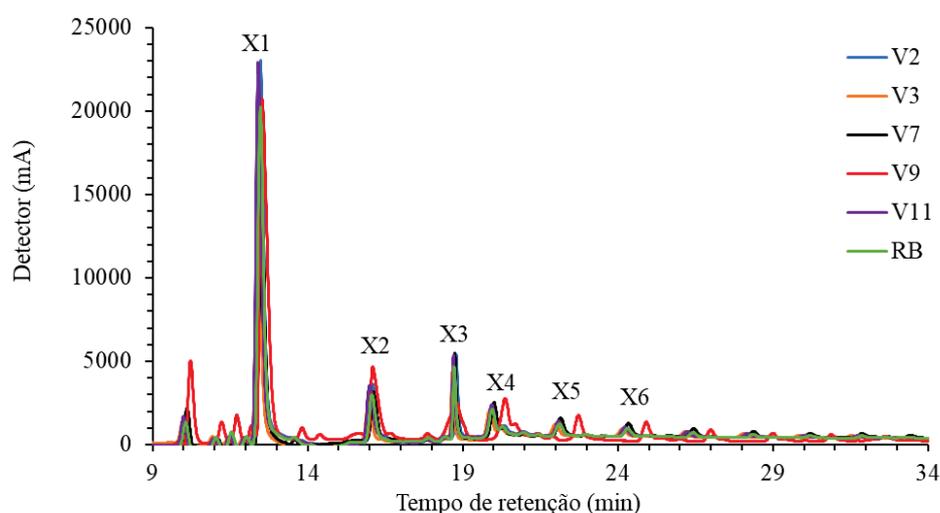
Figura 23- Perfil cromatográfico das frações solúveis em água obtidas após pré-tratamento por explosão a vapor de amostras de cana energia e do material de referência (RB): (A) carboidratos e ácidos orgânicos; (B) compostos furânicos





Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Figura 24- Oligossacarídeos formados a partir da hidrólise das hemiceluloses durante pré-tratamento a vapor

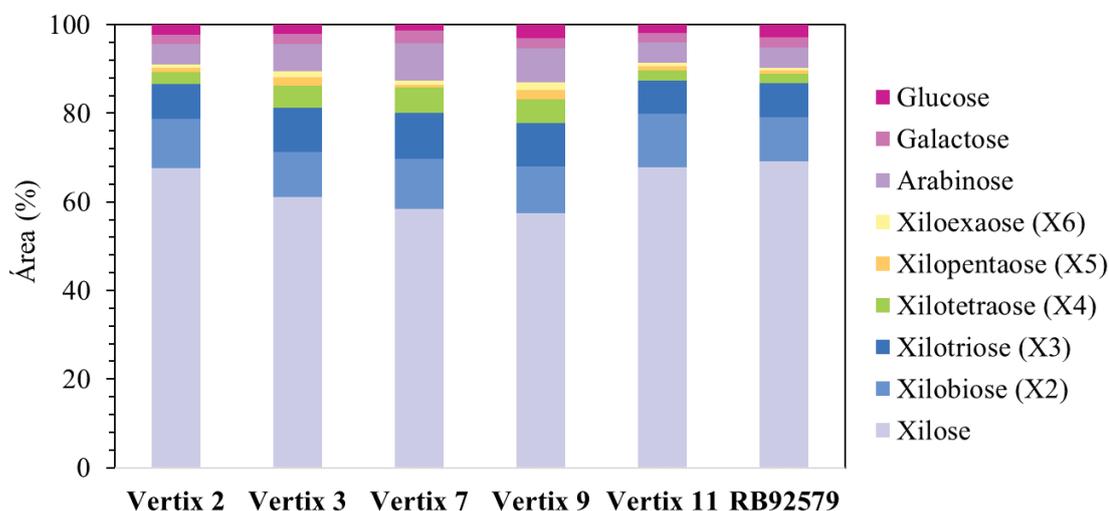


Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Devido à indisponibilidade de padrões XOs para a quantificação das amostras, o método de normalização de área foi empregado para mensurar a formação dos oligômeros a partir dos diferentes substratos. A Figura 25 demonstra que os XOs obtidos no pré-tratamento são compostos majoritariamente de 2 a 6 unidades de xilose. De acordo com Brenelli *et al.*, (2020), a auto-hidrólise por explosão a vapor é propensa à formação de XOs com grau de polimerização de 2 a 6 unidades, já que a desacetilação das hemiceluloses durante o pré-tratamento contribui para a alta solubilidade dos XOs em água. O grau de polimerização e recuperação destes compostos está diretamente atrelado à reatividade das hemiceluloses e às

condições operacionais do pré-tratamento (grau de severidade e adição de catalisadores). As condições operacionais aplicadas no pré-tratamento da cana-energia ocasionaram maior formação do monossacarídeo xilose, em comparação às frações de oligossacarídeos, demonstrando assim a labilidade ácida dessa fração. A Figura 25 revela a predominância de XOs de 5 e 6 unidades nas amostras Vertex 3 e Vertex 9. Em contrapartida, os maiores percentuais de xilose foram observados nas amostras Vertex 11, Vertex 2 e RB92579. Estes dados sugerem que as hemiceluloses das amostras Vertex 11, Vertex 2 e RB92579 são proporcionalmente mais propensas à hidrólise ácida do que as demais.

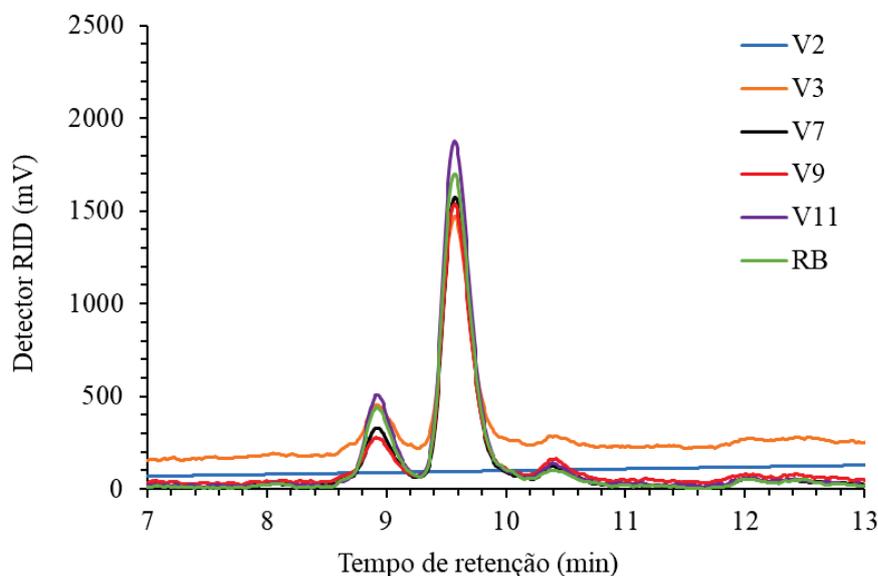
Figura 25- Normalização de área dos cromatogramas obtidos para a análise dos oligossacarídeos derivados das hemiceluloses por explosão a vapor



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Para quantificar todos os oligômeros na forma de monossacarídeos, os licores de pré-tratamento (fração C5) referentes às primeira e segunda lavagens das fibras pré-tratadas foram submetidos a uma etapa de pós-hidrólise com ácido sulfúrico diluído e reanálise por cromatografia a líquido. A Figura 26 mostra a quantificação dos componentes obtidos após procedimento de pós-hidrólise.

Figura 26- Perfil cromatográfico após análise por HPLC das frações solúveis obtidas após o pré-tratamento (auto-hidrólise), após procedimento de pós-hidrólise



Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

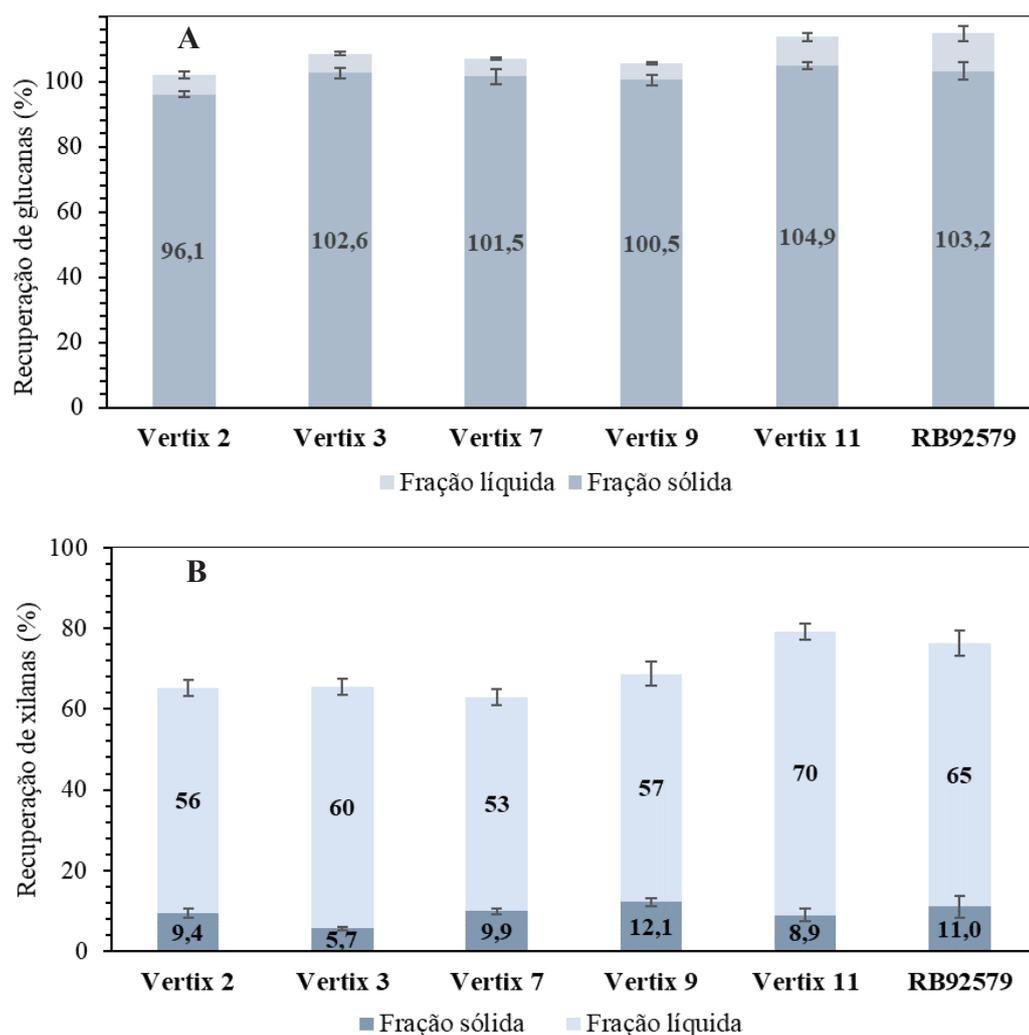
Nota-se que a hidrólise foi completa para todas as amostras devido à ausência de oligossacarídeos no tempo de retenção de 8 min. Com os resultados obtidos na pós-hidrólise, um balanço de massa completo foi realizado para o processo de pré-tratamento. A Tabela 7 apresenta esses resultados, que representam a eficiência obtida na recuperação dos principais componentes dos bagaços nas frações líquida e sólida. Já os valores de recuperação de glucanas e de xilanas presentes nas frações sólida e líquida estão representados na Figura 27. Para todas as amostras a recuperação de glucanas (Figura 27A) ultrapassou 100%; portanto, nota-se que as glucanas não sofreram hidrólise ácida em grande extensão, sendo majoritariamente recuperadas na fração sólida. Por outro lado, os resultados excedentes podem ser atribuídos a possíveis erros na aferição de umidade ou na amostragem e análise cromatográfica das diferentes frações. Pitarelo *et al.* (2016) também obteve uma recuperação de glucanas próxima a 100% em amostras de cana-de-açúcar pré-tratadas nas mesmas condições operacionais.

Tabela 7- Recuperação mássica dos componentes presentes nas frações sólida e líquida após pré-tratamento a vapor

Amostras	Recuperação fração sólida (%)			Recuperação fração líquida (%)			
	AnGlc	AnXyl	Lignina	AnGlc	AnXyl	AnAra	Grupo acetil
Vertex 2	96,1±0,8	8,6±0,1	76,6±0,6	6,0±1,0	55,5±3,0	50,0±3,0	62,0±0,9
Vertex 3	103,0±1,0	9,2±0,1	90,0±1,0	5,9±0,5	62,0±2,8	42,0±1,0	59,0±1,2
Vertex 7	102,0±2,0	8,5±0,2	90,0±2,0	5,5±0,5	52,0±2,5	64,0±4,0	56,0±1,2
Vertex 9	101,0±1,0	11,7±0,2	81,3±1,3	5,2±0,4	53,0±2,7	62,0±2,8	85,0±2,6
Vertex 11	105,0±1,0	10,8±0,1	86,5±0,9	8,8±1,0	70,0±2,8	49,0±3,4	88,0±1,9
RB92579	104,0±2,0	14,2±0,4	83,0±2,0	12,0±2,0	65,0±3,0	52,0±2,0	75,1±1,7

Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Figura 27- Recuperação de (A) glucanas e (B) xilanas nas frações sólida e líquida para a explosão a vapor a 195°C por 7,5 min dos bagaços de cana-energia e cana-de-açúcar



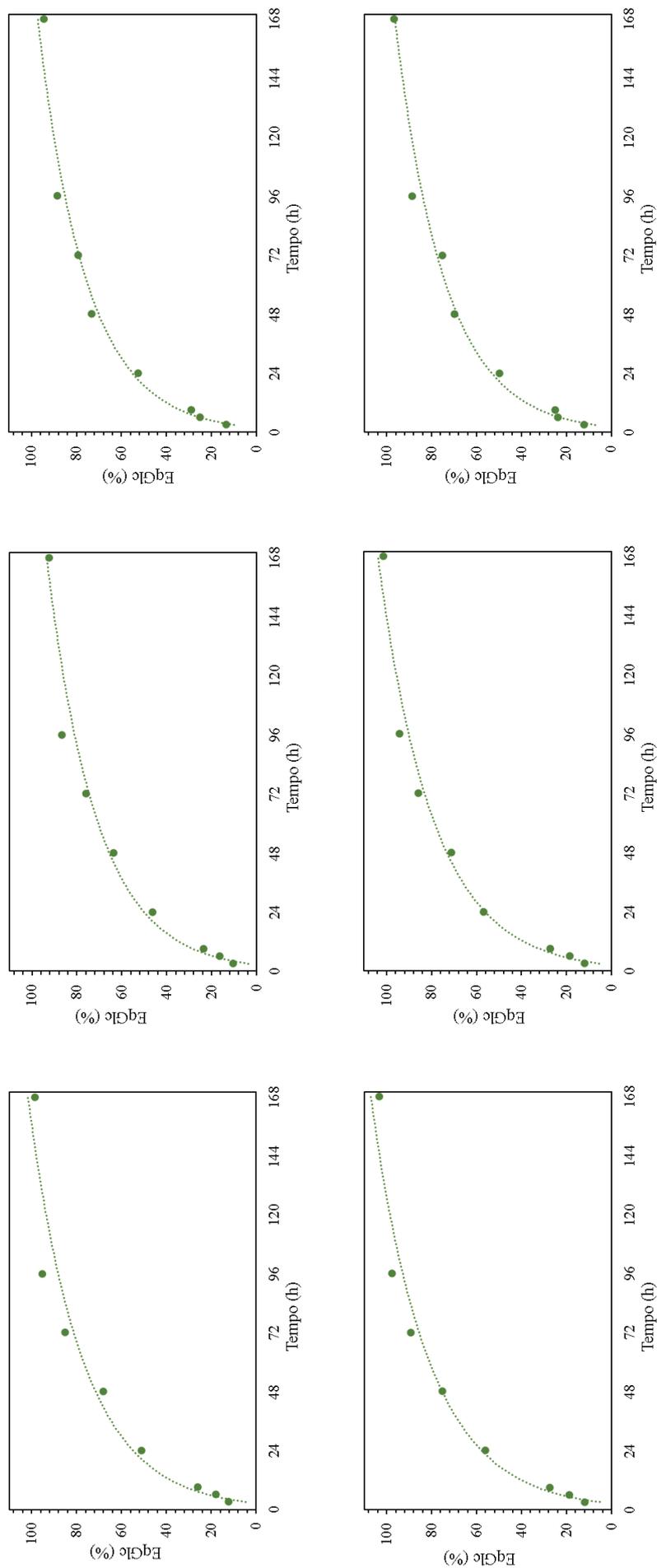
Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Com relação à recuperação de xilanas, percebe-se a sua predominância na fração líquida devido às reações de hidrólise, uma vez que as hemiceluloses apresentam maior labilidade ácida do que as glucanas (majoritariamente celulose), sendo assim convertidas em produtos hidrossolúveis. Essa predisposição à hidrólise ácida pode ser explicada pelo baixo grau de polimerização das hemiceluloses que, devido ao seu caráter amorfo, são facilmente solvatadas, facilitando também a protonação do oxigênio glicosídico, principalmente em seus pontos de ramificação. Além disso, as ligações  $\beta$ -(1,4) das xilanas são mais suscetíveis à hidrólise ácida do que as presentes na celulose. Além disso, os grupamentos substituintes das xilanas também podem ser facilmente hidrolisáveis, como a arabinose de conformação  $\alpha$ -furanosídica e os grupos acetila, por estarem conectados à cadeia por ligações éster. Como visto na Figura 27B, a recuperação total de xilanas nas amostras RB92579 e Vertex 11 foram superiores às recuperações obtidas das demais amostras.

#### 5.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A acessibilidade dos substratos pré-tratados lavados com água foi determinada por meio de um ensaio preliminar baseado na norma NREL/TP 5100-63351 (RESCH *et al.*, 2015). Nesse ensaio, empregou-se um baixo teor de sólidos totais e alta carga enzimática para maximizar o acesso das enzimas ao substrato celulósico. Os resultados obtidos durante a hidrólise enzimática a 2% de sólidos totais encontram-se na Figura 28, onde os perfis revelam o rendimento de hidrólise, ou seja, a quantidade de glucose produzida em relação ao teor de glucose (na forma de glucanas) do material de origem. As hidrólises ocorreram até 168 h e nesse período não houve queda na concentração de monossacarídeos; sendo assim, conclui-se que não houve contaminação microbiana durante os experimentos e que o sistema reacional foi conduzido em condições suficientemente assépticas, mesmo que nenhum inibidor de crescimento tenha sido adicionado ao meio. Em 96 h, as amostras Vertex 7, Vertex 9 e RB92579 apresentaram os maiores rendimento de glucose 97,5%, 94,3% e 95,3%, respectivamente, enquanto a Vertex 2, Vertex 3 e Vertex 11 resultaram em valores um pouco inferiores, de 86,6%, 88,5% e 88,7%. Considerando-se os erros experimentais associados a esse procedimento, conclui-se que o bagaço Vertex 2 foi o pior dentre os materiais submetidos ao pré-tratamento por explosão a vapor nas condições empregadas nesse estudo, enquanto os bagaços Vertex 7 e Vertex 9 foram os de desempenho mais similar ao substrato controle (RB92579).

Figura 28- Perfil de hidrólise enzimática dos materiais explodidos a vapor em relação ao rendimento de equivalentes de glucose para experimentos realizados a 2% de sólidos totais com 30 mg g<sup>-1</sup> de Cellic C Tec3: (A) RB92579, (B) Vertex 2, (C) Vertex 3, (D) Vertex 7, (E) Vertex 9 e (F) Vertex 11



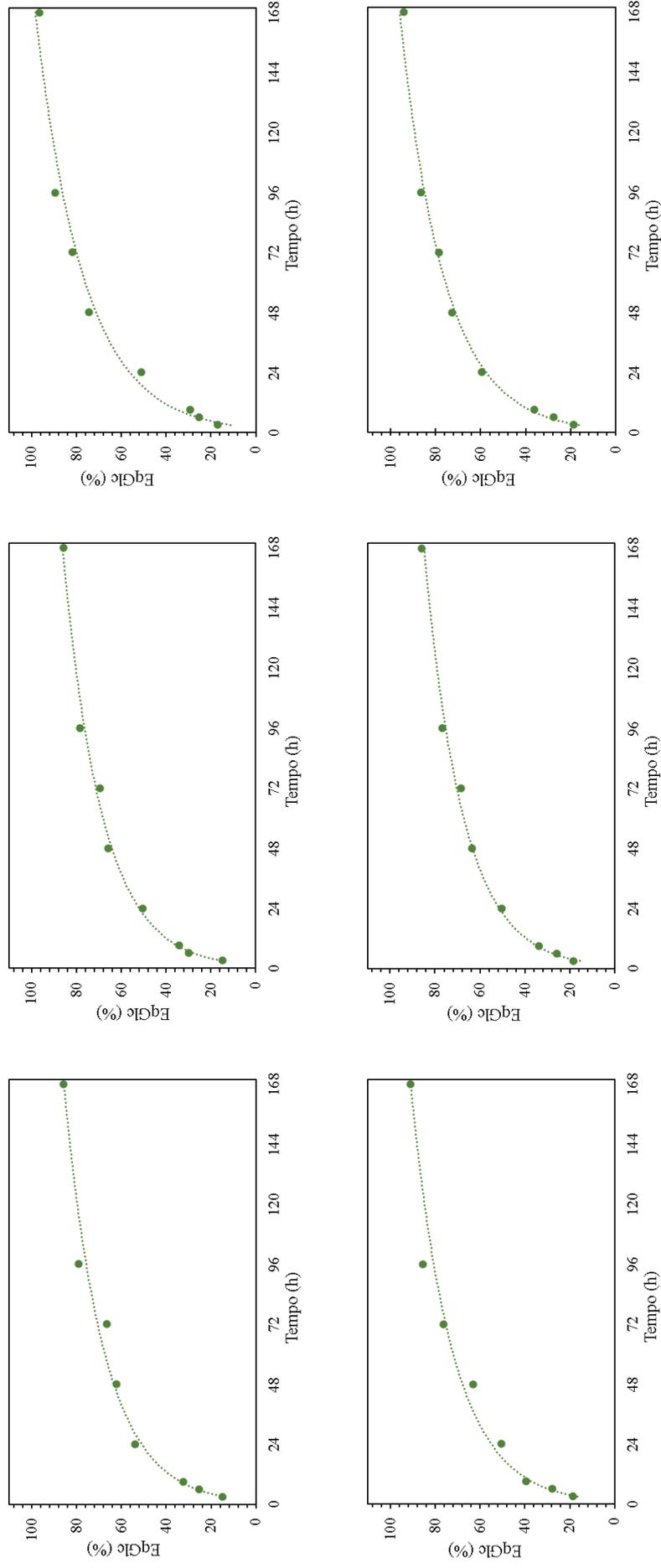
Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

A conversão das xilanas não foi monitorada nos ensaios de hidrólise enzimática devido ao seu baixo teor nos diferentes materiais pré-tratados. Após a verificação da acessibilidade das amostras, ensaios com teor de sólidos igual a 15% foram realizadas para simular um cenário mais próximo às condições operacionais de um processo industrial. As Figura 29 e Figura 30 apresentam os perfis de hidrólise em relação ao rendimento de equivalentes de glucose e a concentração de glucose, respectivamente. Os rendimentos de glucose, obtidos após 96 h de reação, foram de 78,3%, 89,4%, 85,5%; 76,7%, 86,5% e 79,1% para as amostras Vertix 2, Vertix 3, Vertix 7, Vertix 9, Vertix 11 e RB92579, respectivamente (Figura 29). Esses resultados, ao serem comparados com os valores obtidos a 2% de sólidos totais no mesmo tempo de reação, revelam que houve uma diminuição na eficiência (exceto para a amostra Vertix 3) que pode ser justificada por possíveis limitações de difusão decorrentes do emprego de altas concentrações de sólidos, que se caracterizam por baixa fluidez e alta viscosidade, acarretando perfis de concentração não homogêneos. A alta viscosidade na mistura causa restrições severas na transferência convectiva de enzimas no sistema. Além disso, a aglomeração das partículas da biomassa afeta significativamente as características de interface das partículas de biomassa e o estado de distribuição da água, resultando em efeitos difusionais adversos e problemas de transferência de enzimas do líquido para a superfície do substrato e vice-versa (SUN *et al.*, 2022).

Neves *et al.* (2016) avaliaram a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (195°C e 7,5 min) a um teor de sólidos de 12%, empregando 62,5 mg g<sup>-1</sup> bagaço da enzima Cellic CTec2 (Novozymes). Os resultados mostraram uma conversão em equivalentes de glucose próxima a 100%, portanto, superiores aos valores obtidos no presente trabalho. Embora tenha sido utilizada uma carga enzimática 4% inferior, essa diferença não teria sido suficiente para justificar a distância observada entre os valores de rendimento. Portanto, tal fato deve ter sido fruto da diferença entre a concentração de sólidos que, nos experimentos conduzidos por Neves *et al.* (2016), foi 20% inferior ao realizado no presente trabalho.

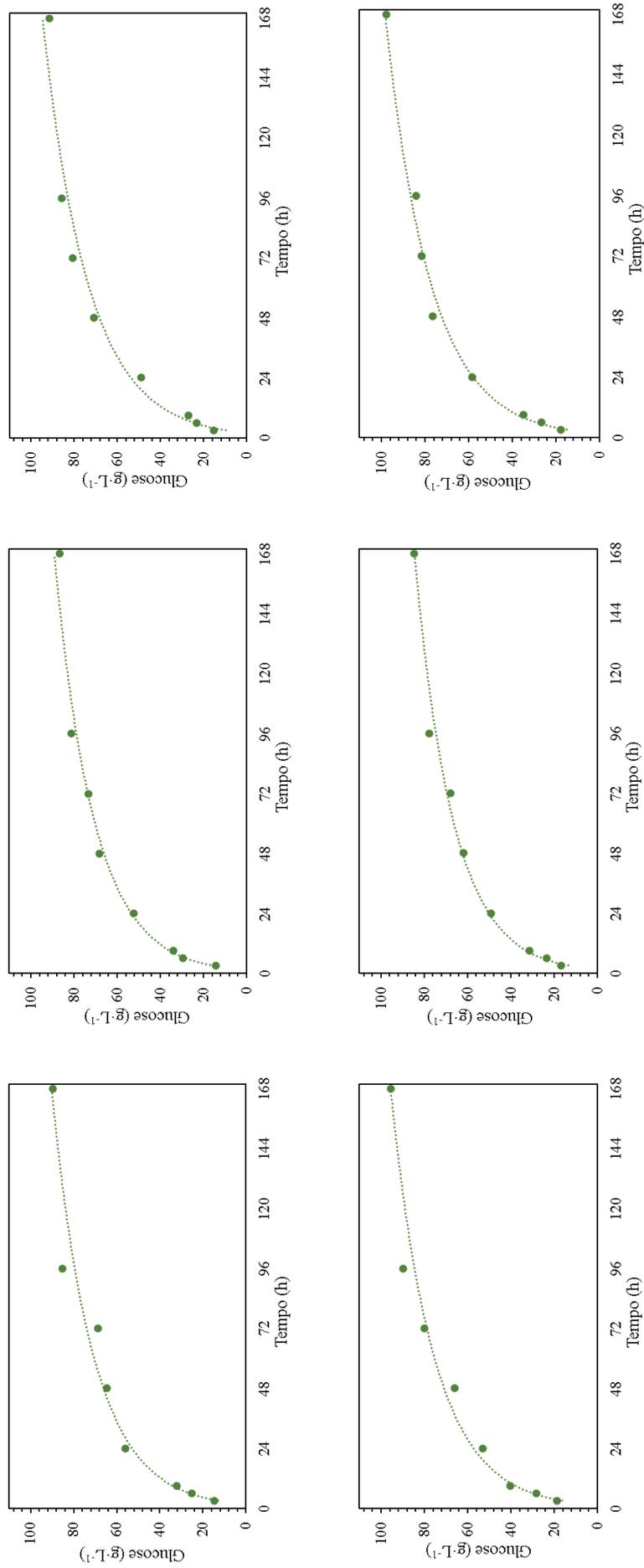
Em um estudo similar, Fockink *et al.* (2018) realizaram ensaios de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor (195°C e 15 min) empregando 15% de sólidos totais e 23,1 FPU·g<sup>-1</sup> de glucanas da enzima Cellic CTec3 (Novozymes). Nestas condições, o rendimento de hidrólise em equivalentes de glucose foi de 95,3%. Embora os resultados apresentados na Figura 29 sejam inferiores, as concentrações de glucose obtidas Fockink *et al.* (2018) corresponderam a 86 g·L<sup>-1</sup>, valor similar aos apresentados na Figura 30 .

Figura 29- Perfil de hidrólise enzimática dos materiais explodidos a vapor em relação ao rendimento de equivalentes de glicose para experimentos realizados a 15% de sólidos totais com 60 mg g<sup>-1</sup> de Cellic CTec3: (A) RB92579, (B) Vertex 2, (C) Vertex 3, (D) Vertex 7, (E) Vertex 9 e (F) Vertex 11



Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Figura 30- Perfil de hidrólise dos materiais explodidos a vapor em relação à concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) de glucose para experimentos realizados a 15% de sólidos totais com  $60 \text{ mg g}^{-1}$  de Cellic CTec3: (A) RB92579, (B) Vertix 2, (C) Vertix 3, (D) Vertix 7, (E) Vertix 9 e (F) Vertix 11



Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Para as amostras Vertix 3, Vertix 7, Vertix 11 e RB92579 (85,8, 89,7, 84,3 e 85,2 g·L<sup>-1</sup> de glucose, respectivamente). Segundo Dimos *et al.* (2019), para se alcançar viabilidade econômica na recuperação de etanol a partir de hidrolisados fermentados, sua concentração deve ser de no mínimo 4% (ou 40 g·L<sup>-1</sup>), levando em consideração uma conversão teórica de 0,51 durante o processo fermentativo. Assim, a hidrólise enzimática deve fornecer concentrações de açúcares fermentescíveis superiores a 80 g·L<sup>-1</sup>. Nas condições experimentais utilizadas nesse trabalho, esse valor foi atingido em 72 h de hidrólise para as amostras Vertix 3, Vertix 7 e Vertix 11, sugerindo que estas apresentam maior potencial para aplicação industrial.

#### **5.4.1 Aumento de escala da hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados**

A hidrólise enzimática em biorreator de bancada foi realizada conforme descrito no item 4.6. As reações foram realizadas para avaliar o efeito do aumento de escala sobre os experimentos de hidrólise enzimática com alto teor sólidos e produzir substratos o suficiente para os ensaios de fermentação. Para isso, empregou-se um biorreator de bancada com volume útil de 1500 mL. Os resultados obtidos foram comparados aos experimentos realizados em incubadora orbital com frascos Erlenmeyers (83 mL) por 72 h, empregando 15% de sólidos totais e carga enzimática de 60 mg·g<sup>-1</sup> de material seco (11,1 FPU·g<sup>-1</sup> de material). Os experimentos foram executados com todos os substratos pré-tratados a vapor após lavagem aquosa, que foram efetuadas para minimizar a presença de produtos inibitórios decorrentes do pré-tratamento, garantindo assim a conversão enzimática da celulose na ausência de fatores limitantes. Após finalização do experimento, o meio reacional foi centrifugado e a fração líquida (hidrolisado enzimático) foi reservada para a fermentação (processo SHF). A Tabela 8 exibe os rendimentos percentuais em equivalentes de glucose para os experimentos realizados em biorreator e em incubadora orbital, ambos realizados em duplicata. Os resultados para a hidrólise em biorreator foram ligeiramente superiores, exceto para as amostras Vertix 7 e RB92579.

Tabela 8- Comparação dos rendimentos de glucose obtidos após 72 h de hidrólise enzimática a 15% de sólidos totais em biorreator de bancada e frascos Enlermeyer

Amostras	Rendimento em EqGlc (%)	
	Biorreator de bancada	Frasco Enlermeyer
RB92579	60,6±0,7	67,0±1,7
Vertex 2	74,0±3,0	70,0±2,0
Vertex 3	86,8±1,0	82,0±2,0
Vertex 7	72,0±2,0	77,0±1,0
Vertex 9	77,0±1,0	68,6±3,0
Vertex 11	84,0±2,0	79,0±1,0

Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

O incremento na conversão de glucanas pode ser justificado pela uniformização do aquecimento e pela melhor distribuição de fibras no meio reacional, proporcionado pelos sistemas de agitação e de aquecimento do biorreator. Segundo Caspeta *et al.* (2014), o uso de impulsores na agitação é capaz de produzir concentrações de glucose 1,3 vezes mais altas do que frascos agitados. Além disso, é possível notar que o aumento da escala de hidrólise até 15% de sólidos não apresenta limitações acentuadas em relação à transferência de calor e massa, como observado anteriormente por Fockink *et al.* (2016). As características do biorreator desempenham papel importante na eficiência de hidrólise. As pás de agitação usadas no biorreator convencional aumentam a transferência de massa convectiva de enzimas e substrato. A eficiência da mistura é determinada pela taxa, fluxo e padrões de mistura fornecidos pelos impulsores. O padrão de mistura pode ser classificado como radial ou axial. Os impulsores com pás planas utilizados no presente trabalho apresentam um fluxo radial (PINO *et al.*, 2018). No entanto, esses impulsores apresentam a desvantagem de criar um padrão de mistura em estágios produzindo uma interação enzima-substrato menos uniforme (DENG *et al.*, 2023; PINO *et al.*, 2018; GARCIA-AGUIRRE *et al.*, 2009).

Corrêa *et al.* (2016), avaliaram a influência de quatro configurações de impulsores duplos (turbinas de Rushton combinadas, turbinas de Rushton com um impulsor de orelha de elefante com bombeamento descendente e ascendente, e impulsores de orelha elefante com bombeamento descendente e ascendente) para melhorar a transferência de massa durante a hidrólise enzimática de bagaço-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor (205°C por 20 min). O substrato foi submetido à hidrólise em reator empregando 10% de sólidos totais e 10 FPU g<sup>-1</sup> de biomassa. A conversão máxima obtida foi de 75,7% em 96 h utilizando

impulsores do tipo turbinas orelha elefante de bombeamento descendente e ascendente. Os impulsores mostraram uma mistura mais eficiente e homogênea devido à ocorrência de fluxos axiais e radiais. O uso da turbina Rushton nas demais configurações evidenciou a formação de uma região estagnada próximo à parede do reator, sendo essa região causada pela predominância do fluxo radial. Os autores alegaram que para reduzir este efeito seria necessário empregar velocidades de agitação mais altas, o que resultaria em um aumento no consumo de energia.

Sandri *et al.* (2023), exploraram várias estratégias de alimentação para melhorar o desempenho da hidrólise enzimática empregando alto teor de sólidos em diferentes temperaturas. Para isso, os autores utilizaram como biomassa o bagaço de cana-de-açúcar submetido a um pré-tratamento hidrotérmico. Ensaio de hidrólise em batelada alimentada foram realizadas por 72 h em um biorreator com agitação helicoidal. A carga enzimática total empregada foi de  $45 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1}$  celulose com teor de sólidos de 22,5%. A conversão máxima obtida nesse experimento foi de 75,45%. Com base nos resultados observados na literatura é possível observar que apesar do presente trabalho não empregar a configuração de impulsores mais adequada para agitação de meios viscosos, entretanto, os resultados de conversão enzimática são comparáveis a literatura. Ainda, analisando os resultados da sacarificação em biorreator, observa-se que a amostra controle (RB92579) gerou o pior rendimento (60,6%) dentre as amostras. Esse resultado demonstra que, nas condições empregadas neste estudo, todas as amostras de cana-energia apresentaram susceptibilidade à conversão enzimática efetivamente superior ao material genético de origem.

## 5.5 FERMENTAÇÃO

Para avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados enzimáticos produzidos a partir dos substratos pré-tratados duas amostras foram selecionadas, a RB92579 por ser a amostra controle e a Vertex 11 por apresentar a maior concentração de glucose em 72 h de hidrólise. Os hidrolisados foram submetidos à fermentação por 24 h em biorreator utilizando a levedura *S. cerevisiae* como descrito no item 4.7.2. A Tabela 9 apresenta a concentração inicial de glucose, a concentração de etanol, a produção teórica de etanol e o seu rendimento, em comparação a um meio sintético de glucose utilizado como controle. Os dados apresentados foram gerados a partir de experimentos em duplicata.

Tabela 9- Rendimento de etanol de hidrolisados enzimáticos e solução padrão de glucose

Parâmetros	Padrão	Vertex 11	RB92579
Concentração inicial de glucose ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	80,0±1,0	80,0±0,7	62,5±0,7
Produção teórica de etanol ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	40,6	40,6	31,9
Concentração de etanol ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	34,9±0,5	33,7±0,1	27,4±0,2
Rendimento etanol (%)	86,0±1,0	83,0±0,4	86,5±0,7

Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Observa-se na Tabela 9 que o potencial fermentativo das amostras é muito semelhante ao obtido para a solução padrão de glucose. Isso demonstra que durante a hidrólise do substrato lignificado não houve a liberação de nenhum inibidor capaz de influenciar o metabolismo da levedura, já que a presença destes resultaria em uma diminuição da viabilidade e da vitalidade celular e, conseqüentemente, em uma redução do rendimento de produto (NDUBUISI *et al.*, 2023).

Os ensaios de fermentação foram realizados por 24 h, porém, o consumo de glucose se estabilizou após 12 h, sugerindo que o processo poderia ter sido interrompido neste momento sem perda de eficiência. Por isso, os dados fornecidos na Tabela 9 foram estabelecidos com base neste tempo de fermentação. Após 12 h, as concentrações de etanol foram de 33,7  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e 27,4  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para os hidrolisados Vertex 11 e RB92579, com rendimentos de etanol de 83% e 86,5%, respectivamente. Observa-se que apesar da maior eficiência, a concentração de etanol obtida para a amostra RB92579 foi relativamente menor. Este resultado está relacionado à menor capacidade de sacarificação dessa amostra na etapa de hidrólise, produzindo um hidrolisado com menor teor de açúcares fermentescíveis.

As concentrações e os rendimentos de etanol obtidas nesse trabalho foram comparados com outros valores encontrados na literatura. Neves *et al* (2016) trabalharam com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor em condições idênticas ao presente trabalho (195°C e 7,5 min) e obtiveram, após fermentação, um rendimento de 85,5% (25,2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de etanol) a partir de um hidrolisado com 57,8  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucose. Em um estudo similar, Da Silva *et al.* (2016) avaliaram a fermentabilidade do bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor seguida de extração alcalina. A maior eficiência fermentativa obtida foi de 91,4% para amostra lavada com álcali, porém, o material explodido a vapor produziu 25,6  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de etanol para um rendimento de 87,1%. Ambos os estudos demonstraram rendimentos semelhantes aos obtidos neste trabalho para a amostra RB92579.

Dionísio *et al.* (2021) propuseram um estudo para a obtenção de etanol celulósico a partir de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. O hidrolisado enzimático do material lavado com água (fração C6) foi fermentado com *S. cerevisiae* CAT-1 empregando um processo descontínuo com reciclagem de células, no qual foi obtida uma conversão máxima de 80%. A concentração de etanol foi de  $50,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  partindo de um hidrolisado com  $123,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucose.

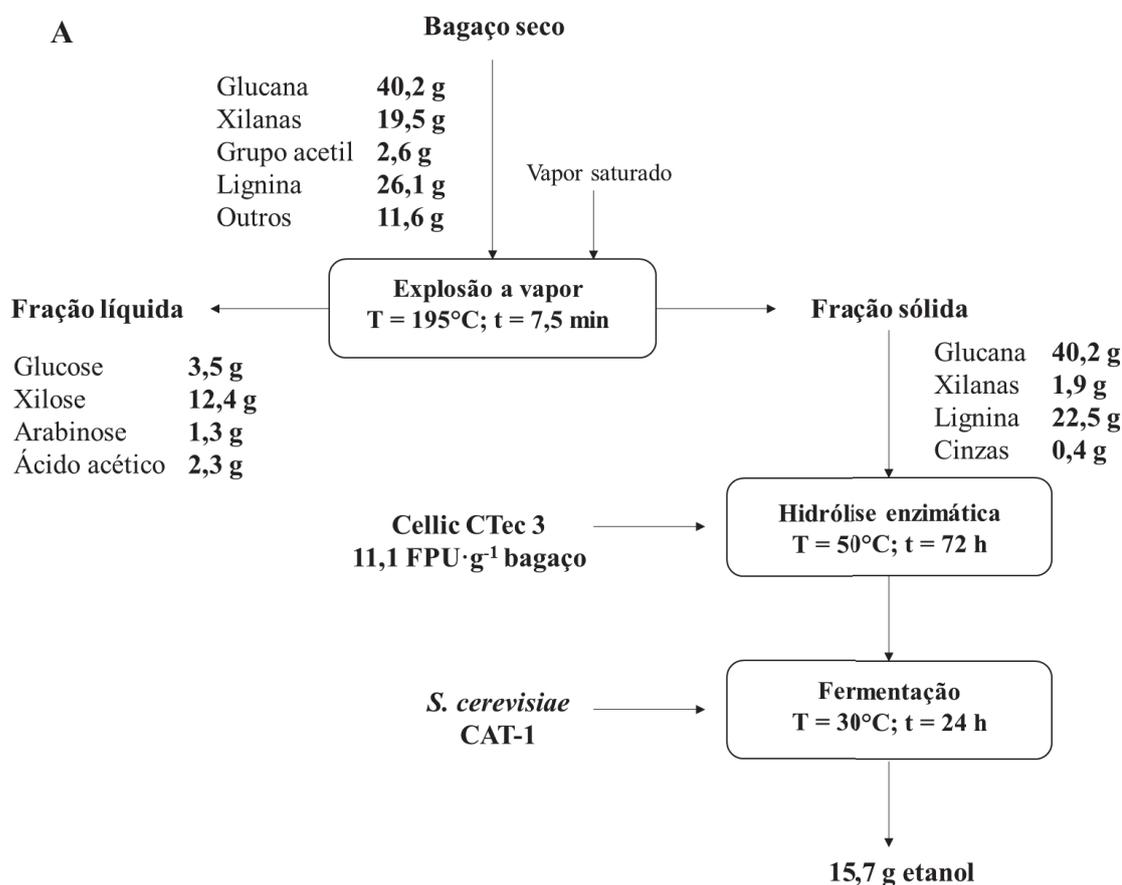
Saini *et al.* (2023) investigaram a sacarificação e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar empregando um pré-tratamento químico sequencial com 3%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$ ) e 5% NaOH ( $\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$ ). A levedura empregada nos experimentos de fermentação foi a *Kluyveromyces marxianus* modificada para tolerar altas concentrações de inibidores. Em experimentos de SHF o título máximo de etanol obtido foi de  $55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , que correspondeu a uma eficiência de 87% na fermentação. Scarpa *et al.* (2019) realizaram a sacarificação enzimática de cana-de-açúcar exposta a pré-tratamento hidrotérmico alcalino com carga de sólidos igual a 13,5% e 288 unidades totais de endoglucanase por grama de celulose presente no ensaio. O hidrolisado obtido foi fermentado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e o rendimento de etanol foi de 73,5%.

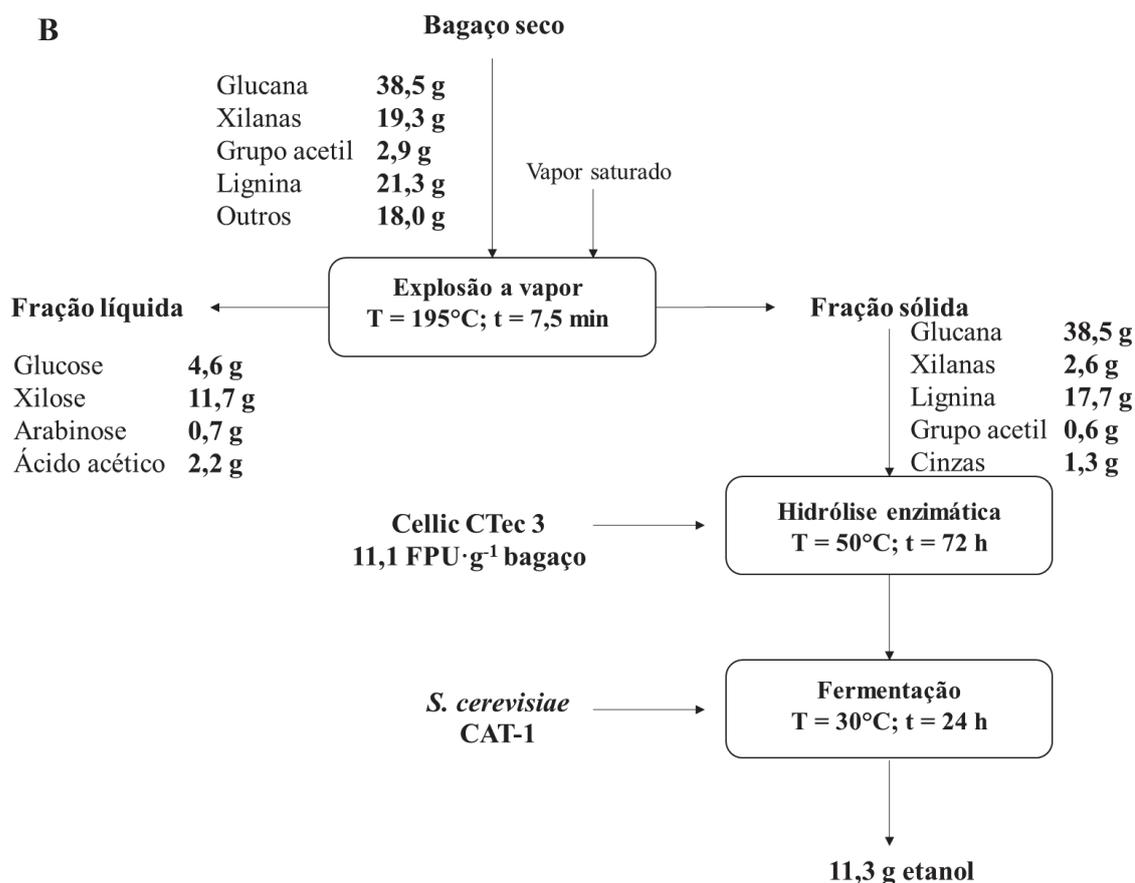
Segundo Dimos *et al.* (2019), destilação do etanol é economicamente viável apenas quando a sua concentração é igual ou superior a 4% ( $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), situação não atingida pelas amostras Vertex 11 e RB92579 devido aos objetivos e condições experimentais estabelecidas nesse trabalho. Entretanto, pequenos ajustes experimentais podem ser realizados no processo para aumentar a concentração de glucose destinada à fermentação e, conseqüentemente, resultar em maiores títulos de etanol no produto. O aumento da carga de sólidos durante a hidrólise enzimática permite atingir esse objetivo (CHIARELLO *et al.*, 2016). Porém, devido a complicações de transferência de massa, abordagens como a hidrólise em batelada alimentada despontam como alternativa viável para alcançar altas concentrações de açúcar sem aumentar significativamente a viscosidade do meio (DE MOURA *et al.*, 2023). A co-fermentação da fração hemicelulósica também é uma alternativa para aumentar os títulos de etanol. Para isso, faz-se necessário utilizar um microrganismo fermentador de pentoses (ANTUNES *et al.*, 2021; DIONÍSIO *et al.*, 2020; RECH *et al.*, 2019). Caso nenhuma dessas opções demonstre aplicabilidade, pode-se ainda propor o enriquecimento de hidrolisados enzimáticos, ou mesmo de licores de pré-tratamento, com caldo de cana concentrado ou melaço de cana oriundos da rota de produção de etanol de primeira geração. No entanto, etapas adicionais de destoxificação poderão ser necessárias para a remoção de inibidores eventualmente presentes no meio (KORDALA *et al.*, 2021; PAN *et al.*; 2019).

## 6 BALANÇO DE MASSAS

Com os percentuais da recuperação mássica do pré-tratamento e a eficiência de conversão das etapas de hidrólise enzimática e fermentação, realizou-se um balanço mássico da produção de etanol a partir das amostras Vertix 11 e RB92579. A Figura 31 apresenta de forma simplificada a massa de etanol obtida para 100 g de bagaço pré-tratado a vapor. Vale ressaltar que, devido às condições resultantes do procedimento experimental descrito no item 5.3, a recuperação da fração sólida foi estabelecida como sendo igual a 100%. Portanto, a massa de glucanas após pré-tratamento foi mantida igual à inicial.

Figura 31- Produção de etanol celulósico a partir do pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática das amostras (A) Vertix 11 e (B) RB92579





Fonte: Elaborada pela Autora, 2023.

Ao analisar a Figura 31 nota-se que a massa de etanol produzida a partir do bagaço de cana-energia (Vertex 11) foi aproximadamente 40% superior à obtida da cana-de-açúcar que lhe deu origem (RB92579). Esses resultados representam 156,8 e 112,8 Kg ou 198,7 e 142,9 L de etanol por tonelada de bagaço seco para as amostras Vertex 11 e RB92579, respectivamente. A principal vantagem da cana-energia em relação à cana-de-açúcar reside em sua capacidade de produzir uma maior quantidade de biomassa por unidade de área. Dados fornecidos pela GranBio (Tabela 4) demonstram que a produtividade média de fibra no primeiro corte para o cultivar Vertex 11 é de 36,7 ton·ha<sup>-1</sup>, enquanto para RB92579 é de apenas 15,6 ton·ha<sup>-1</sup>. Com essa produtividade, a Vertex 11 é capaz de gerar 7.293 L·ha<sup>-1</sup> de etanol oriundo da fração C6 (hexoses), em comparação com 2.230 L·ha<sup>-1</sup> do cultivar RB92579. O único cultivar que apresentou produtividade de biomassa superior à Vertex 11 foi a Vertex 2, enquanto a Vertex 9 teve desempenho semelhante em termos da produção de biomassa em base seca por hectare. Por outro lado, a amostra Vertex 11 se destaca ao apresentar a maior produtividade de açúcar redutor por área plantada entre os três cultivares mencionados acima, além do segundo maior percentual de fibra na biomassa produzida. Vale ressaltar que, embora

a amostra Vertex 3 tenha apresentado o maior teor de açúcares redutores totais, seu teor de fibras na biomassa foi o menor dentre as demais.

Diante desses resultados, podemos concluir que a amostra Vertex 11 se apresenta como uma opção bastante promissora, uma vez que além de apresentar um alto percentual de recuperação mássica na explosão a vapor e de conversão na hidrólise enzimática, também possui uma alta produtividade no campo e elevados teores de açúcar redutor total e teor de fibras na biomassa. Portanto, a Vertex 11 é o cultivar de maior potencial industrial para a produção integrada de etanol de primeira e segunda geração. Além disso, a Vertex 11 mantém alta produtividade após o primeiro corte, permitindo a produção de  $6.668 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$  de etanol na cana rессoca (terceiro corte), enquanto a cana-de-açúcar RB92579, devido ao declínio da produção de biomassa, poderia gerar apenas  $1.193 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$ . Ao considerar uma eficiência de 90% no processo de primeira geração, a Vertex 11 poderá gerar em torno de  $7.887 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$  de etanol, enquanto a amostra RB92579 geraria rendimentos próximos a  $8.283 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$ . No entanto, ao considerar a produção de etanol a partir das duas rotas, os rendimentos integrados atingiriam  $10.513$  e  $15.180 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$  para a RB92579 e Vertex 11, respectivamente. Esses resultados reforçam a vantagem da incorporação do etanol de segunda geração a partir da cana-energia em termos de maior produtividade de biomassa e, conseqüentemente, maior produção de etanol por área cultivada. Além disso, o potencial desse cultivar haveria de ser ainda mais relevante caso a fração C5 ou licor de pré-tratamento também tivesse sido fermentado a etanol.

Apesar de não terem sido alcançadas altas concentrações de etanol nos fermentados dos hidrolisados enzimáticos, os resultados obtidos nesse trabalho são comparáveis a outros estudos já realizados na área de produção de etanol a partir de fermentação de hexoses. Um exemplo é o estudo de Dionísio *et al.* (2021), em que a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído alcançou  $197,9 \text{ Kg}$  de etanol por tonelada de bagaço seco pela co-fermentação de pentoses e hexoses, sendo a fermentação das hexoses responsável por  $99,1 \text{ Kg}$  de etanol. O processo envolveu  $72 \text{ h}$  de hidrólise enzimática com carga enzimática de  $10 \text{ FPU}$  de enzima por grama de material seco.

Pereira *et al.* (2021) obtiveram  $93,7 \text{ Kg}$  de etanol por tonelada de bagaço seco a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor ( $190^\circ\text{C}$  e  $15 \text{ min}$ ) e extração alcalina. A hidrólise foi conduzida com  $17,5\%$  de sólidos e carga enzimática de  $15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de material deslignificado por  $72 \text{ h}$ . Já o estudo de Da Silva Martins *et al.* (2015) investigou o efeito de três pré-tratamentos (ácido sulfúrico diluído, peróxido de hidrogênio alcalino e hipoclorito-peróxido de hidrogênio) na produção de etanol de segunda geração a partir de

cana-de-açúcar. Eles obtiveram entre 100,9 e 135,4 Kg de etanol por tonelada de bagaço (base seca), sendo o melhor resultado alcançado pelo pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino e hidrólise com teor de sólidos igual a 10%, em uma hidrólise enzimática realizada em batelada alimentada com carga enzimática de 15 FPU de celulasas e 25 CBU de beta-glucodidase por grama de bagaço pré-tratado.

## 7 EXTRAÇÃO DA LIGNINA

Buscando intensificar o uso de cultivares de cana-energia para aplicação em projetos de biorrefinaria, todos os materiais pré-tratados a vapor foram extraídos com etanol em um sistema Soxhlet para avaliar a extratibilidade da lignina que, uma vez isolada, poderá ser destinada à aplicações de alto valor agregado. A extração da lignina com etanol é um método suave e ambientalmente amigável, quando comparada às extrações alcalinas. Uma das principais vantagens desse processo é a fácil recuperação do solvente, que pode ser reciclado, simplificando o gerenciamento da lignina recuperada. Além disso, é importante ressaltar que a fração celulósica livre de lignina pode apresentar uma maior acessibilidade durante a hidrólise enzimática, o que pode resultar em rendimentos maiores de equivalentes de glucose, sem a necessidade de aumentar as cargas enzimáticas. A Tabela 10 evidencia que o material derivado da Vertix 11 apresentou o maior rendimento de recuperação de lignina, gerando assim um argumento adicional à seleção desse como o melhor cultivar para o desenvolvimento de projetos de segunda geração.

Tabela 10- Percentual de lignina extraída e rendimento mássico da extração

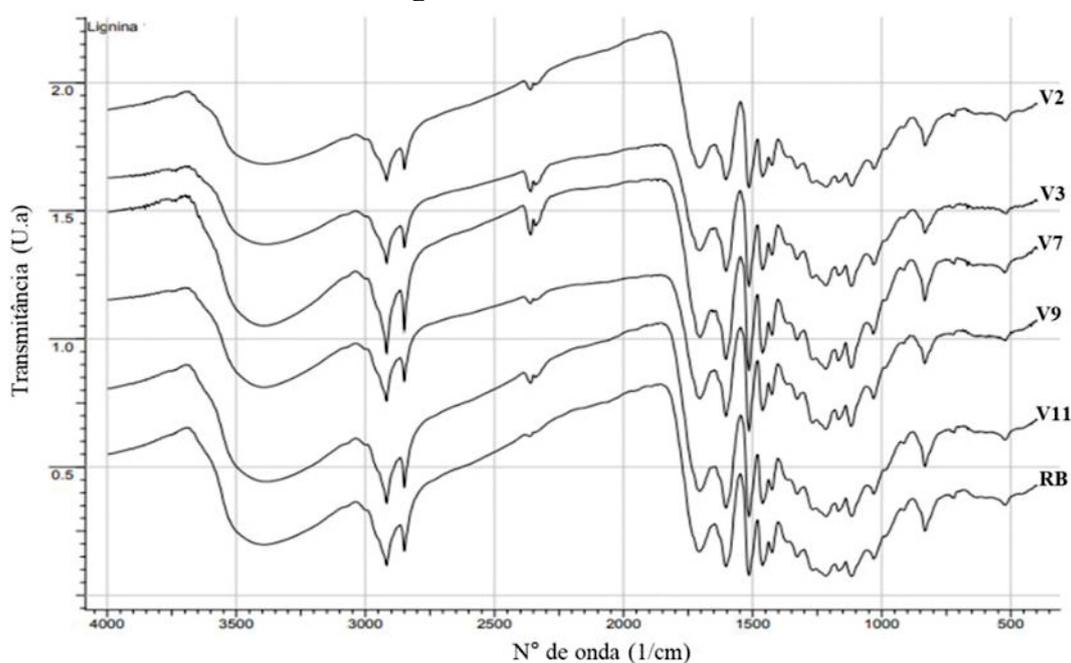
Amostras	Rendimento do extrato (%)	Recuperação da lignina (%)
Vertix 2	20,2 ± 0,6	61,4
Vertix 3	25,0 ± 1,0	68,4
Vertix 7	25,0 ± 1,0	77,1
Vertix 9	21,3 ± 0,7	66,1
Vertix 11	30,7 ± 0,7	93,3
RB92579	19,7 ± 0,1	70,9

Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Com o objetivo de comparar a composição das diferentes ligninas isoladas por extração etanólica a partir dos substratos pré-tratados, as amostras foram submetidas à análise

por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de infravermelho estão apresentados na Figura 32. Por meio dessa técnica, foi possível observar que as ligninas das variedades de cana pré-tratadas apresentam grupos funcionais bastante semelhantes., como indicam as vibrações de hidroxilas associadas ( $3600$  a  $3100\text{ cm}^{-1}$ ), vibrações de C-H em  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  ( $3000$  a  $2800\text{ cm}^{-1}$ ), grupamentos oxigenados na forma de carbonilas em cetonas e ésteres ( $1750$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$  e as vibrações do esqueleto aromático ( $1600$ - $1450\text{ cm}^{-1}$ ) (SZCZERBOWSKI *et al.*, 2014).

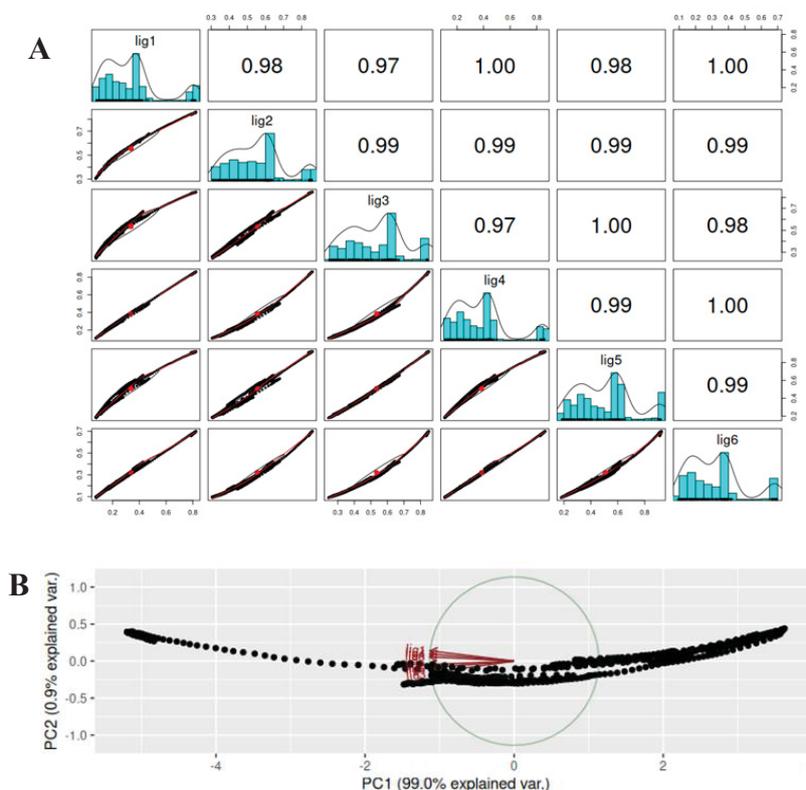
Figura 32- Comparação dos espectros obtidos na região do infravermelho das ligninas extraídas em etanol



Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Apesar de visualmente não ser possível observar diferenças nos perfis espectrais das ligninas, como forma de confirmação técnica, os espectros foram submetidos a análise de PCA (Análise de Componentes Principais). A primeira etapa nesta avaliação é submeter uma matriz matemática (espectros) a uma análise de correlação, para um posterior agrupamento no PCA a matriz não pode ter relação direta. A Figura 33A apresenta a análise de correlação matricial dos espectros das ligninas extraídas. É muito evidente que existe uma relação direta entre todas as amostras, com valores de correlação ente  $0,97$ - $0,99$ . Assim, as amostras não possuem nenhuma frequência no infravermelho, ou seja, grupo funcional, que seja capaz de diferenciar as ligninas. Este fato é mais bem visualizado na Figura 33B onde as amostras estão todas no mesmo quadrante da relação de componente 1 e componente 2.

Figura 33 - Correlação matricial dos espectros de lignina extraída das variedades de cana (A) e correlação de componentes principais (B).



Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Com base nesses resultados, fica evidente que não há diferença expressiva em relação à presença de grupos funcionais na cadeia polimérica das ligninas, cujo aproveitamento apresenta grande potencial para o desenvolvimento de processos de biorrefinaria. Isso reforça a importância desse avanço no desenvolvimento de tecnologias de produção eficientes, visando a utilização integral da biomassa lignocelulósica e a valorização de seus componentes.

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para a composição química das amostras de cana-energia não apresentaram variações significativas em relação à amostra controle, no que tange aos teores de carboidratos como glucanas e hemiceluloses. Para os teores de lignina apenas a amostra Vertex 3 apresentou diferença estatística com relação à amostra controle.

A explosão a vapor mostrou-se eficaz para o fracionamento dos três principais componentes macromoleculares das amostras de bagaço de cana-energia, solubilizando a fração hemicelulósica e promovendo alta recuperação de glucanas na fração sólida fibrosa. Nesse sentido, vale ressaltar que as amostras Vertex 2 e Vertex 9 apresentaram diferenças estatisticamente significativas em termos de recuperação mássica (fração sólida), em comparação à amostra Vertex 11. No entanto, a influência de perdas físicas ao longo do processo não pode ser descartada, já que o processo foi realizado em um reator de batelada.

O pré-tratamento por explosão a vapor proporcionou um aumento da suscetibilidade à hidrólise enzimática de todas as amostras envolvidas nesse estudo. Para os ensaios de acessibilidade a 2% de sólidos totais, verificou-se que, dentre as variedades de cana energia, a Vertex 2 apresentou menor rendimento de hidrólise se comparada às demais. As hidrólises a 15% de sólidos apresentaram rendimentos compatíveis com dados da literatura, mas, nas condições experimentais empregadas nesse estudo, apenas as amostras Vertex 2, Vertex 7 e Vertex 11 resultaram em concentrações de glucose iguais ou superiores a  $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Os ensaios de fermentação apresentaram rendimentos percentuais comparáveis a literatura, porém nas condições experimentais empregadas os títulos de etanol obtidos não foram suficientes para viabilizar o processo de produção de etanol celulósico, sendo necessários mudanças na etapa de hidrólise enzimática. O balanço mássico realizado para a amostra Vertex 11 e amostra controle RB92579 demonstram a superioridade da cana-energia com relação a cana-de-açúcar para a produção de etanol celulósico por unidade de área plantada ao consideração a produção de etanol a partir da incorporação da rota 2G. Além disso, foi possível observar que o cultivo da cana-energia é capaz de promover maior estabilidade na produção de etanol celulósico devido a sua capacidade de manter a produtividade de biomassa após primeiro corte. Ao avaliar a extratabilidade da lignina em etanol presente na biomassa tratada, foi possível observar que a Vertex 11 apresenta potencial para a aplicação em um conceito de biorrefinaria, devido a sua alta recuperação em etanol.

## REFERÊNCIAS

AFEDZI, A. E. K.; RATTANAPORN, K.; PARAKULSUKSATID, P. Impeller selection for mixing high-solids lignocellulosic biomass in stirred tank bioreactor for ethanol production. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, p. 100935, 2022.

AGRAWAL, R. *et al.* Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 332, p. 125042, 2021.

AL-MARDEAI, S. *et al.* Radial flow tubular membrane bioreactor for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic waste biomass. **Fuel**, v. 341, p. 127648, 2023.

ALMEIDA, C.S; NASCIMENTO, D.D; Revisão: leveduras utilizadas na produção de etanol de segunda geração. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 11, n. 1, p. 99-119, 2021

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010

ALYASSIN, M *et al.* Simultaneous determination of cereal monosaccharides, xylo- and arabinoxylo-oligosaccharides and uronic acids using HPAEC-PAD. **Food chemistry**, v. 315, p. 126221, 2020.

AMERAM, N.; MUHAMMAD, S.; YUSOF, N. A. A. N.; ISHAK, S.; ALI, A.; SHOPARWE, N. F.; TER, T. P. Chemical composition in sugarcane bagasse: Delignification with sodium hydroxide. **Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences**. v. 15, no. 2, p. 232-236, 2019.

ANTUNES, F. A. F. *et al.* Sustainable second-generation ethanol production from switchgrass biomass via co-fermentation of pentoses and hexoses using novel wild yeasts. **BioEnergy Research**, p. 1-12, 2021.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2011.

ARNI, S. A. Extraction and Isolation methods for lignin separation from sugarcane bagasse: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p. 330-339, 2018

BAPTISTA, M.; DOMINGUES, L. *Kluyveromyces marxianus* as a microbial cell factory for lignocellulosic biomass valorisation. **Biotechnology Advances**, p. 108027, 2022.

BARBOSA, K. L. *et al.* Pré-tratamento de explosão a vapor, caracterização química e morfológica do bagaço da cana-de-açúcar usado para produção de Etanol 2G. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 1, 2020.

BAZOTI, S. F. *et al.* Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 582-587, 2017.

BENJAMIN, Y. H.; CHENG, H.; GÖRGENS, J. F. Optimization of dilute sulfuric acid pretreatment to maximize combined sugar yield from sugarcane bagasse for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, p. 610-630, 2014

BHAT, A. H. *et al.* Cellulose an ageless renewable green nanomaterial for medical applications: An overview of ionic liquids in extraction, separation, and dissolution of cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 750-777, 2019.

BHATIA, S. K. *et al.* Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource technology**, v. 300, p. 122724, 2020.

BHUTTO, A W. *et al.* Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 122, p. 724-745, 2017.

BHUYAR, P. *et al.* Advancements of fermentable sugar yield by pretreatment and steam explosion during enzymatic saccharification of *Amorphophallus sp.* starchy tuber for bioethanol production. **Fuel**, v. 323, p. 124406, 2022.

BONATTO, C. *et al.* Experimental data and modelling of 2G ethanol production by *Wickerhamomyces sp.* UFFS-CE-3.1. 2. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2445-2450, 2020.

BONDESSON, P.M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Ethanol and biogas production after steam pretreatment of corn stover with or without the addition of sulphuric acid. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, p. 1-11, 2013.

BOSCHIERO, B. N. *et al.* Biomass production and nutrient removal of energy cane genotypes in Northeastern Brazil. **Crop Science**, v. 59, n. 1, p. 379-391, 2019.

BRENELLI, L. B. *et al.* Xylo-oligosaccharides, fermentable sugars, and bioenergy production from sugarcane straw using steam explosion pretreatment at pilot-scale. **Bioresource Technology**, v. 357, p. 127093, 2022.

CAI, X. *et al.* Efficient high-solids enzymatic hydrolysis of corncobs by an acidic pretreatment and a fed-batch feeding mode. **Bioresource Technology**, v. 326, p. 124768, 2021.

CASPETA, L. *et al.* Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. **Applied Energy**, v. 113, p. 277-286, 2014.

CECCATO-ANTONINI, S. R, *et al.* Deterioration and fermentability of energy cane juice. **Ciência Rural**, v. 47, 2017

CHEN, J *et al.* Integrating enzymatic hydrolysis into subcritical water pretreatment optimization for bioethanol production from wheat straw. **Science of the Total Environment**, v. 770, p. 145321, 2021.

CHEN, W *et al.* Pilot-scale study on the acid-catalyzed steam explosion of rice straw using a continuous pretreatment system. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 297-304, 2013.

CHIARELLO, L. M. *et al.* Production of cellulosic ethanol from steam-exploded *Eucalyptus urograndis* and sugarcane bagasse at high total solids and low enzyme loadings. **Sustainable Chemical Processes**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2016.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar. Primeiro levantamento, v. 1, Safra 2022/23, 2022.

CORRÊA, L. J.; BADINO, A. C.; CRUZ, A. J. G. Mixing design for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: methodology for selection of impeller configuration. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 285-294, 2016.

CRUZ, N. C.; SILVA, F. C.; TARELHO, L. A. C.; RODRIGUES, S. M. Critical review of key variables affecting potential recycling applications of ash produced at largescale biomass combustion plants. **Resources, Conservation and Recycling**. v.150, n. 104427, 2019.

CUNHA, J. T. *et al.* Engineered *Saccharomyces cerevisiae* for lignocellulosic valorization: a review and perspectives on bioethanol production. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 883-903, 2020.

DA SILVA MARTINS, L. H.; RABELO, S. C.; DA COSTA, A. C. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 312-321, 2015.

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

DA SILVA, V. L. *et al.* Cana energia e produção de silagem como estratégia para alimentação animal. **Veterinária e Zootecnia**, v. 27, p. 1-13, 2020.

DE ARAUJO GUILHERME, A. *et al.* Ethanol production from sugarcane bagasse: Use of different fermentation strategies to enhance an environmental-friendly process. **Journal of Environmental Management**, v. 234, p. 44-51, 2018.

DE MOURA, M. G. G. *et al.* Fed-batch Enzymatic Hydrolysis of Steam-exploded Sugarcane Bagasse. **BioResources**, v. 18, n. 2, p. 3160-3177, 2023.

DENG, Z. *et al.* A bio-inspired flexible squeezing reactor for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioenergy production. **Renewable Energy**, v. 191, p. 92-100, 2022.

DIMOS, K. *et al.* Effect of various pretreatment methods on bioethanol production from cotton stalks. **Fermentation**, v. 5, n. 1, p. 5, 2019.

DING, S.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 597-606, 2006

DINIZ, A. L. *et al.* Genomic resources for energy cane breeding in the post genomics era. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 1404-1414, 2019.

DIONÍSIO, S. R. *et al.* Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse. **Fuel**, v. 304, p. 121290, 2021.

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

DOS SANTOS, L *et al.* Second-generation ethanol: the need is becoming a reality. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 40-57, 2016.

DU, J. *et al.* Enzymatic liquefaction and saccharification of pretreated corn stover at high-solids concentrations in a horizontal rotating bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 173-181, 2014.

DUQUE, A. *et al.* Steam explosion as lignocellulosic biomass pretreatment. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock based Biorefinery**, p. 349-368, 2016.

ELIODÓRIO, K. P. *et al.* Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bio-ethanol, beer and wine. **Advances in Applied Microbiology**, v. 109, p. 61-119, 2019.

FANELLI, A *et al.* Biomass composition of two new energy cane cultivars compared with their ancestral *Saccharum spontaneum* during internode development. **Biomass and Bioenergy**, v. 141, p. 105696, 2020.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Ed. New York, NY, USA: Walter de Gruyter, 1989.

FERNANDES, D. R. *et al.* Panorama Geral da Utilização de Líquidos Iônicos para Fracionamento e Transformação da Biomassa Lignocelulósica. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 6, p. 1431-1456, 2021.

FERNANDES-KLANJ, F. *et al.* Comparison of fermentation strategies for ethanol production from olive tree pruning biomass. **Industrial Crops and Products** v. 122, n. 15, p. 98- 106, 2018.

FIGUEIREDO, P.; LINTINEN, K.; HIRVONEN, J. T.; KOSTIAINEN, M. A.; SANTOS, H. A. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**. v.93, p. 233-269, 2018.

FOCKINK, D. H.; MACENO, M. A. C.; RAMOS, L. P. Production of cellulosic ethanol from cotton processing residues after pretreatment with dilute sodium hydroxide and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 91-96, 2015.

FOCKINK, D. H; SÁNCHEZ, J. H; RAMOS, L. P. Comprehensive analysis of sugarcane bagasse steam explosion using autocatalysis and dilute acid hydrolysis (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) at equivalent combined severity factors. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 563-572, 2018.

FONTES, A. M. *et al.* Micro/nanostructured lignonanocellulose obtained from steam-exploded sugarcane bagasse. **Cellulose**, v. 28, n. 16, p. 10163-10182, 2021.

FONTES, A. M. **Obtenção de lignonanocelulose a partir do bagaço de cana explodido a vapor e avaliação de seu efeito sobre as propriedades mecânicas de papel kraft**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Paraná, Curitiba, 2020.

GARCIA-AGUIRRE, M. *et al.* Strategy for biotechnological process design applied to the enzymatic hydrolysis of agave fructo-oligosaccharides to obtain fructose-rich syrups. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10205-10210, 2009.

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

GRANGEIA, C.; SANTOS, L.; LÁZARO, L. L. B. A política brasileira de biocombustíveis (RenovaBio) e suas incertezas: uma avaliação de aspectos técnicos, socioeconômicos e institucionais. **Conversão e Gestão de Energia: X**, v. 13, p. 100156, 2022.

GRASSI, M. C. B.; PEREIRA, G. A. G. Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 201-205, 2019.

GUO, H. *et al.* Enzymes and enzymatic mechanisms in enzymatic degradation of lignocellulosic biomass: A mini-review. **Bioresource Technology**, v. 367, p. 128252, 2023.

HAN, G *et al.* Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 1, p. 28-33, 2010.

HILL, J. *et al.* Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 30, p. 11206-11210, 2006.

HUANG, H. *et al.* Identification of crucial yeast inhibitors in bioethanol and improvement of fermentation at high pH and high total solids. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 16, p. 7486-7493, 2011.

IEA – International Energy Agency, **Electricity Market Report**, 2021.

JACQUET, N. *et al.* Application of steam explosion as pretreatment on lignocellulosic material: a review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 10, p. 2593-2598, 2015.

JOFFRES, B.; LAURENTI, D.; CHARON, N.; DAUDIN, A.; QUIGNARD, A.; GEANTER, C. Thermochemical Conversion of Lignin for Fuels and Chemicals: A Review. **Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP Energies nouvelles**, v. 68, no. 4, pp. 753-763, 2013.

JUNPENG Y.I. *et al.* Steam explosion pretreatment of *Achyranthis bidentatae* radix: Modified polysaccharide and its antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 375, p. 131746, 2022.

KORDALA, N.; LEWANDOWSKA, M.; BEDNARSKI, W. Effect of the method for the elimination of inhibitors present in *Miscanthus giganteus* hydrolysates on ethanol production effectiveness. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-9, 2021.

KUMAR, A. K. *et al.* Application of natural deep eutectic solvents in biomass pretreatment, enzymatic saccharification and cellulosic ethanol production. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 11, p. 23057-23063, 2018.

LI, X. *et al.* Inhibitory effects of lignin on enzymatic hydrolysis: The role of lignin chemistry and molecular weight. **Renewable Energy**, v. 123, p. 664-674, 2018.

LIN, S.; LIN, I. Lignin in Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. 15. VCH Weinheim, 1990.

LIU, C.G. *et al.* Cellulosic ethanol production: progress, challenges and strategies for solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 3, p. 491-504, 2019.

LIU, Y. *et al.* Process optimization for deep eutectic solvent pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse for cellulosic ethanol fermentation. **Renewable Energy**, v. 177, p. 259-267, 2021.

LUDWIG, D. *et al.* High solids enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulosic materials with a powerful stirrer concept. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 1699-1713, 2014.

LUO, Y. *et al.* The production of furfural directly from hemicellulose in lignocellulosic biomass: A review. **Catalysis Today**, v. 319, p. 14-24, 2019.

LYND, L. R.; WYMAN, C. E.; GERNGROSS, T. U. Biocommodity Engineering. **Biotechnol Prog**, v. 15, n. 5, p. 777-793, 1999.

MALIK, K. *et al.* Lignocellulosic biomass for bioethanol: insight into the advanced pretreatment and fermentation approaches. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115569, 2022.

MANFREDI, A. P. *et al.* Integral process assessment of sugarcane agricultural crop residues conversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 241-247, 2018.

MANKAR, A. R. *et al.* Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. **Bioresource Technology**, v. 334, p. 125235, 2021.

MATSUOKA, S. *et al.* Bioenergia da cana. **Cana-de-açúcar: Bioenergia, Açúcar e Álcool**, v. 2, p. 487-517, 2012.

MATSUOKA, S. *et al.* Cana energética: seu conceito, desenvolvimento, características e perspectivas. **Advances in Botany**, v. 2014, 2014.

MATSUOKA, S; RUBIO, L.C.S. Energy cane: A sound alternative of a bioenergy crop for tropics and subtropics. **Sugarcane Biofuels: Status, Potential, and Prospects of the Sweet Crop to Fuel the World**, p. 39-66, 2019.

MEHARIYA, S. *et al.* Co-digestion of food waste and sewage sludge for methane production: Current status and perspective. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 519-531, 2018.

MIKULSKI, D.; KŁOSOWSKI, G. Cellulose hydrolysis and bioethanol production from various types of lignocellulosic biomass after microwave-assisted hydrothermal pretreatment. **Renewable Energy**, v. 206, p. 168-179, 2023.

MORAIS, W. *et al.* Acid pretreatment of sugarcane biomass to obtain hemicellulosic hydrolysate rich in fermentable sugar. **Energy Reports**, v. 6, p. 18-23, 2020.

NDUBUISI, I. A. *et al.* Non-conventional yeast strains: Unexploited resources for effective commercialization of second-generation bioethanol. **Biotechnology Advances**, p. 108100, 2023.

- NETO, A. C.; GUIMARÃES, M. J.C.; FREIRE, E. Business models for commercial scale second-generation bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, v. 184, p. 168-178, 2018.
- NEVES, P.V.; PITARELO, A.P.; RAMOS, L.P. Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor: Efeito do teor de extrativos, catálise ácida e diferentes tecnologias de fermentação. **Tecnologia de Biorecursos**, v. 208, p. 184-194, 2016.
- ONYEMA, V. O. *et al.* A Brief Review: Saccharomyces cerevisiae Biodiversity Potential and Promising Cell Factories for Exploitation in Biotechnology and Industry Processes–West African Natural Yeasts Contribution. **Food Chemistry Advances**, p. 100162, 2022.
- OVEREND, R. P.; CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences**, v. 321, n. 1561, p. 523-536, 1987.
- PAN, L. *et al.* Simultaneous concentration and detoxification of lignocellulosic hydrolysates by novel membrane filtration system for bioethanol production. **Journal of Cleaner Production**, v. 227, p. 1185-1194, 2019.
- PARISUTHAM, V.; KIM, T. H.; LEE, S. K. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 431-440, 2014.
- PARTHIBA KARTHIKEYAN, O. *et al.* Pretreatment of food waste for methane and hydrogen recovery: A review. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 1025–1039, 2018.
- PENALVA SANTOS, D. C. L. *et al.* Brazil and the world market in the development of technologies for the production of second-generation ethanol. **Alexandria Engineering Journal**, v. 67, p. 156-170, 2022.
- PEREIRA, B. *et al.* High yield biorefinery products from sugarcane bagasse: Prebiotic xylooligosaccharides, cellulosic ethanol, cellulose nanofibrils and lignin nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 342, p. 125970, 2021.
- PERRONE, O. M. *et al.* Improving cellulosic ethanol production using ozonolysis and acid as a sugarcane biomass pretreatment in mild conditions. **Bioresource Technology Reports**, v. 13, p. 100628, 2021.
- PINELO, M.; JONSSON, G.; MEYER, A. S. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: molecular and operational features affecting performance. **Separation and Purification Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-11, 2009.
- PINO, M. S. *et al.* Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. **Chemical Engineering Journal**, v. 347, p. 119-136, 2018.
- PIRICH, C. L. *et al.* Disruptive enzyme-based strategies to isolate nanocelluloses: A review. **Cellulose**, v. 27, n. 10, p. 5457-5475, 2020.
- PITARELO, A. P. *et al.* Ethanol production from sugarcane bagasse using phosphoric acid-catalyzed steam explosion. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 1889-1898, 2016.

PRAJAPATI, A. S. *et al.* Review on cellulase and xylanase engineering for biofuel production. **Industrial Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 38-44, 2018.

PULIGUNDLA, P.; OH, S.E.; MOK, C. Microwave-assisted pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass to sugars and ethanol: A review. **Carbon Letters**. v.17, p. 1-10, 2016.

QASEEM, M. F.; SHAHEEN, Humaira; WU, Ai-Min. Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 144, p. 110996, 2021.

QIAO, J. *et al.* Integrated biorefinery approaches for the industrialization of cellulosic ethanol fuel. **Bioresource Technology**, p. 127516, 2022.

QIN, L. *et al.* Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2016.

RALPH J. *et al.* Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 29-60, 2004.

RALPH, J.; LAPIERRE, C.; BOERJAN, W. Lignin structure and its engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 240-249, 2019

RAMOS, L. P. *et al.* Enzymes and biomass pretreatment. In: **Recent Advances in Bioconversion of Lignocellulose to Biofuels and Value-Added Chemicals within the Biorefinery Concept**. Elsevier, 2020. p. 61-100.

RAMOS, L. P. *et al.* Perspectivas à implementação de projetos de biorrefinaria baseadas no uso de materiais lignocelulósicos. **Panorama de la Industria de celulosa y papel y materiales lignocelulósicos**, 2016 p. 84.

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

RAMOS, L. P., Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. **Centro de Pesquisa em Química Aplicada**, p. 11, 2000.

RAMOS, L. P.; SUOTA, M. J.; PAVANELI, G.; CORAZZA, M. L. The role of biomass pretreatment for sustainable biorefineries. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 51, p. 62-68, 2019.

RECH, F. R. *et al.* Fermentation of hexoses and pentoses from sugarcane bagasse hydrolysates into ethanol by *Spathaspora hagerdaliae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, p. 83-92, 2019.

RESCH, M. G.; BAKER, J. O.; DECKER, S. R. Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass Technical Report: NREL/TP-5100-63351, **National Renewable Energy Laboratory**, 2015.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174, 2018.

RUIZ, H. A. *et al.* Severity factor kinetic model as a strategic parameter of hydrothermal processing (steam explosion and liquid hot water) for biomass fractionation under biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 342, p. 125961, 2021.

SAINI, J. K. *et al.* Enhanced cellulosic ethanol production via fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of sequential dilute acid-alkali pretreated sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 372, p. 128671, 2023.

SANDRI, J. P. *et al.* Solid feeding and co-culture strategies for an efficient enzymatic hydrolysis and ethanol production from sugarcane bagasse. **Environmental Technology & Innovation**, v. 30, p. 103082, 2023.

SANTOS, F. *et al.* Production of second-generation ethanol from sugarcane. In: **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**. Academic Press, 2020. p. 195-228.

SARKER, T. R. *et al.* Hydrothermal pretreatment technologies for lignocellulosic biomass: A review of steam explosion and subcritical water hydrolysis. **Chemosphere**, v. 284, p. 131372, 2021.

SCARPA, J. De C. P. *et al.* Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 141, p. 111795, 2019.

SHARMA, S; NAIR, A; SARMA, S J. Biorefinery concept of simultaneous saccharification and co-fermentation: Challenges and improvements. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, v. 169, p. 108634, 2021.

SILVEIRA, M. H. L.; MORAIS, A. R. C.; DA COSTA, A. M. L.; OLEKSZYSZEN, D. N.; BOGEL-LUKASIK, R.; ANDREAUS, J.; RAMOS, L. P. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol & biorefineries. **Chem Sus Chem**. v. 8, p.3366-3390, 2015

SJÖSTRÖM, E. Wood chemistry: fundamentals and applications. San Diego: **Academic Press**, 1993.

SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. Chemical composition of wood and pulps: Basic constituents and their distribution. *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking*. Berlin: Springer Verlag, 1999.

SLUITER, A. *et al.*, D. Determination of Extractives in Biomass - Technical Report: NREL/TP-510-42619, **National Renewable Energy Laboratory**, 2008a.

SLUITER, A. *et al.*, Determination of Ash in Biomass - Technical Report NREL/TP-510-42622. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008c.

SLUITER, A. *et al.*, Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass - Technical Report NREL/TP-510-42618, **National Renewable Energy Laboratory**, 2012.

SLUITER, A. *et al.*, Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. Technical Report NREL/ TP-510-42623. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008c.

SLUITER, A. *et al.*, Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples - Technical Report: NREL/TP510-42621, **National Renewable Energy Laboratory**, 2008b.

SÓTI, V.; LENAERTS, S.; CORNET, I. Of enzyme use in cost-effective high solid simultaneous saccharification and fermentation processes. **Journal of Biotechnology**. v. 270, p. 70-76, 2018.

SUI, W; CHEN, H. Water transfer in steam explosion process of corn stalk. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 977-986, 2015.

SUN, C. *et al.* Advances and perspectives on mass transfer and enzymatic hydrolysis in the enzyme-mediated lignocellulosic biorefinery: A review. **Biotechnology Advances**, p. 108059, 2022.

SUOTA, M. J. *et al.* Lignin Functionalization Strategies and the Potential Applications of Its Derivatives-A Review. **BioResources**, v. 16, n. 3, 2021.

SZCZERBOWSKI, D.; PITARELO, A. P.; FILHO ZANTONÁ, A.; RAMOS, L. P. Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95-101, 2014.

THAMMASITTIRONG, S *et al.* Evaluation of ethanol production from sugar and lignocellulosic part of energy cane. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 598-603, 2017.

TOOR, M *et al.* An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks **Chemosphere**, v. 242, p. 125080, 2020.

VANDENBERGHE S, L. P. *et al.* Xylan. In: **Biomass, Biofuels, Biochemicals**. Elsevier, v 2, p 129-161, 2021.

VANELLI, B. A. **Pré-tratamento de lignocelulose utilizando líquido iônico, etanol e CO2 supercrítico**. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

VANHOLME, R.; DE MEESTER, B.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 230-239, 2019.

VOHRA, M. *et al.* Bioethanol production: Feedstock and current Technologies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. v. 2, p. 573-584, 2014.

XU, C. *et al.* Enhancement of high-solids enzymatic hydrolysis efficiency of alkali pretreated sugarcane bagasse at low cellulase dosage by fed-batch strategy based on optimized accessory enzymes and additives. **Bioresource Technology**, v. 292, 2019.

YANG, S.; DING, W.; CHEN, H. Enzymatic hydrolysis of rice straw in a tubular reactor coupled with UF membrane. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 721-725, 2006.

YOO, C. G. *et al.* The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review. **Bioresource technology**, v. 301, p. 122784, 2020.

YU, Y *et al.* Steam explosion of lignocellulosic biomass for multiple advanced bioenergy processes: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 154, p. 111871, 2022.

ZHANG, C. *et al.* Efficient Way of Carbon Dioxide Utilization in a Gas-to-Methanol Process: From Fundamental Research to Industrial Demonstration. **Topics in Catalysis**, v. 61, n. 18–19, p. 1794–1809, 2018.

ZHANG, H. *et al.* Enhanced enzymatic saccharification and ethanol production of corn stover via pretreatment with urea and steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 376, p. 128856, 2023.

ZHANG, H; HAN, L; DONG, H. An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 140, p. 110758, 2021.

ZHANG, J. *et al.* Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, n. 4, p. 718-728, 2010.

ZHANG, M. *et al.* Enzymatic saccharification of pretreated corn stover in a fed-batch membrane bioreactor. **Bioenergy Research**, v. 4, p. 134-140, 2011.

ZHONG, J. *et al.* State of the art and perspectives in heterogeneous catalysis of CO<sub>2</sub> hydrogenation to methanol. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 5, p. 1385–1413, 2020.

ZOGLHAMI, A.; PAËS, G. Lignocellulosic biomass: understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 874, 2019.

NUSEED,

## ANEXO I- TESTE TUKEY REALIZADO PARA OS COMPONENTES DA CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA APÓS LAVAGEM

Figura A1- Teste de Tukey para os teores médios de anidroglicose das amostras

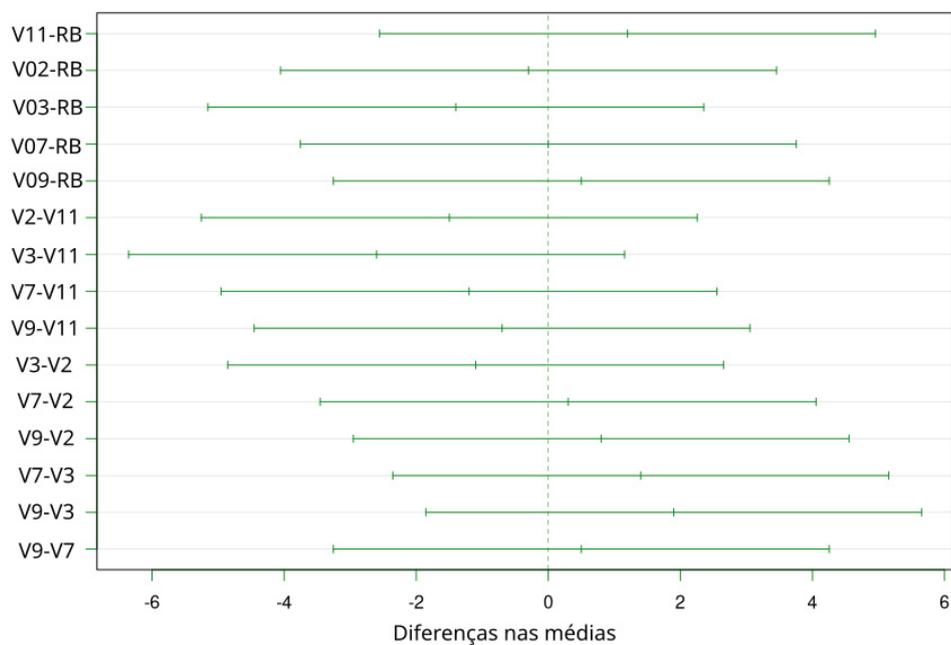


Figura A2: Teste de Tukey para os teores médios de anidroxilose das amostras

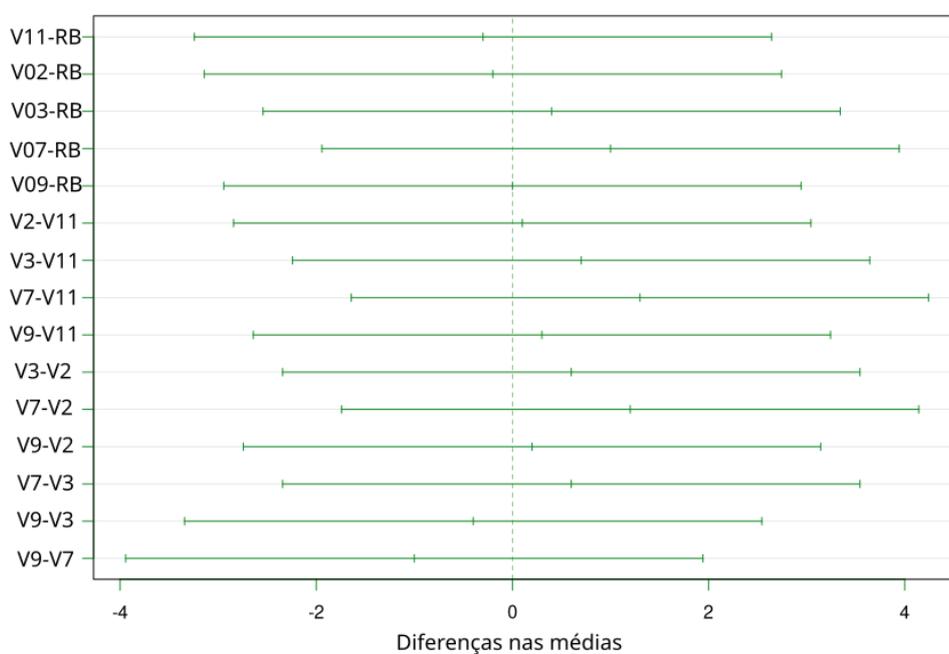


Figura A3: Teste de Tukey para os teores médios de anidroarabinose das amostras

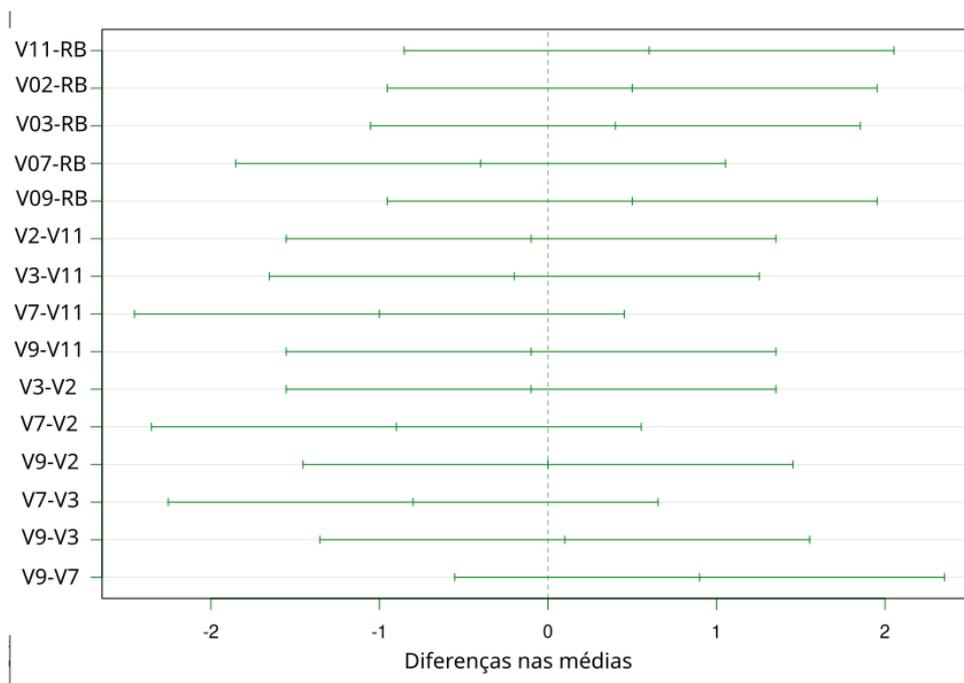


Figura A4: Teste de Tukey para os teores médios do grupo acetil das amostras

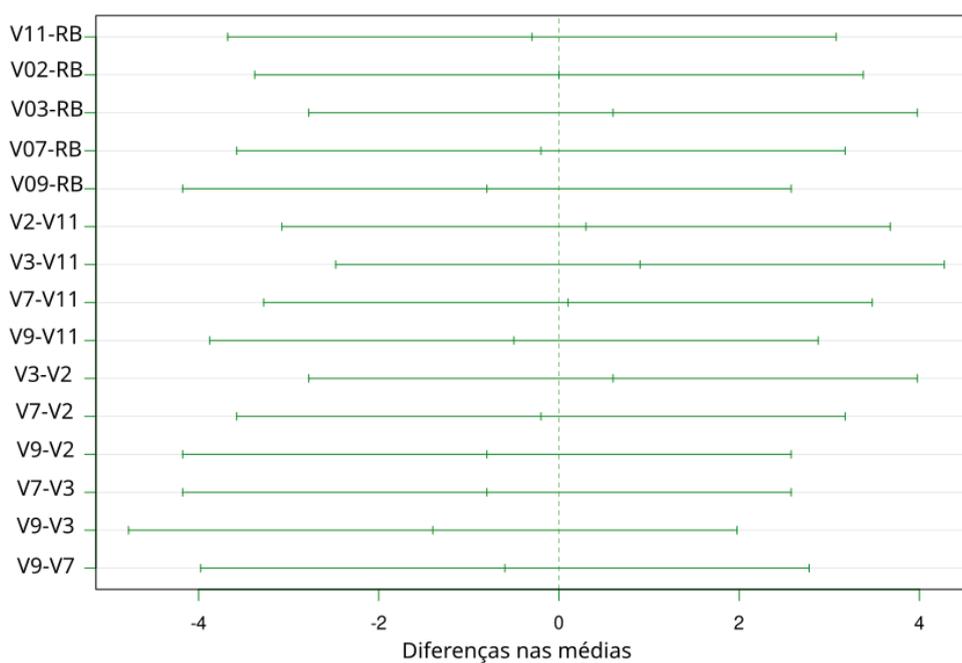


Figura A5: Teste de Tukey para os teores médios da lignina solúvel das amostras

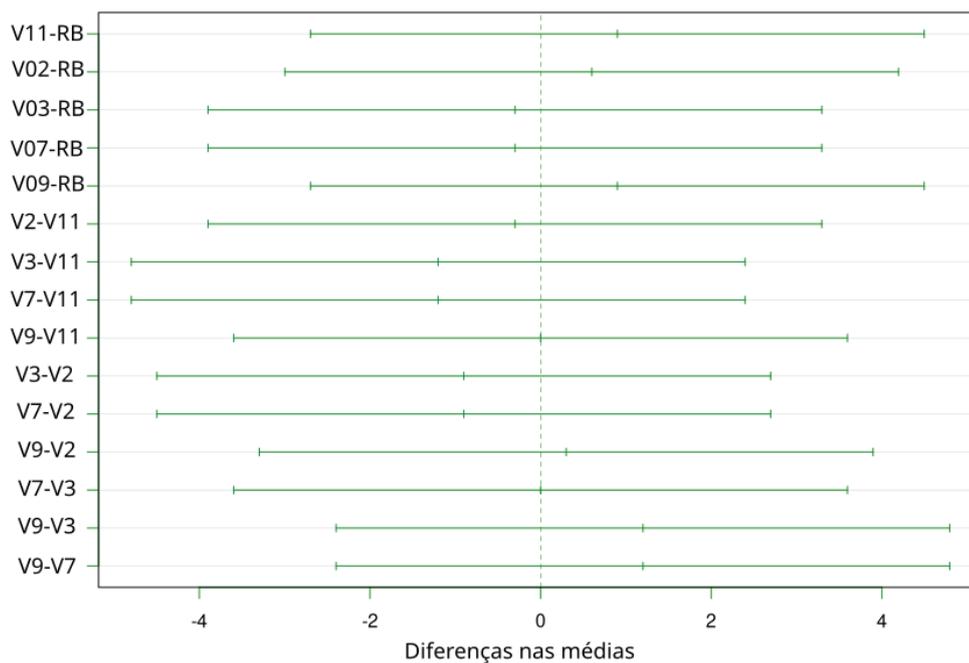


Figura A6: Teste de Tukey para os teores médios de extrativos das amostras

