

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G DE
PSEUDOCAULE DE BANANEIRA POR COCULTURA
MICROBIANA EM BATELADAS SEQUENCIAIS**

MILLENA DA SILVA MONTAGNOLI

**FLORIANÓPOLIS
2017**

Millena da Silva Montagnoli

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G DE PSEUDOCAULE
DE BANANEIRA POR COCULTURA MICROBIANA EM
BATELADAS SEQUENCIAIS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Ozair Souza

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UI

Montagnoli, Millena da Silva

Análise da Produção de Etanol 2G de Pseudocaule de Bananeira por
Cocultura Microbiana em Bateladas Sequenciais / Millena da Silva Montagnoli ;
orientador, Agenor Furigo Júnior ; coorientador, Ozair Souza. – Florianópolis, SC,
2017.

171 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro
Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. bioetanol. 3. regime de operação. 4. pseudocaule
de bananeira. I. Furigo Júnior, Agenor. II. Souza, Ozair. III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV.
Titulo.

Análise da Produção de Etanol 2G de Pseudocaule de Bananeira por
Cocultura Microbiana em Bateladas Sequenciais

por

Millena da Silva Montagnoli

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química, área de Concentração de Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior
Orientador

Prof. Dr. Ozair Souza
coorientador

Prof^a. Dr^a. Cíntia Soares
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Cintia Marangoni

Prof. Dr. José Miguel Mülher

Prof^a. Dr^a. Andréa Lima dos Santos Schneider

Florianópolis, 09 de outubro de 2017.

“Tudo posso n’Aquele que me fortalece”
Filipenses 4:13

AGRADECIMENTOS

José, Rosina e Deisi

Obrigada pela compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Profº. Dr. Ozair Souza

Obrigada pelo apoio, amizade e pelos conhecimentos repassados em todos esses anos de convivência e orientação.

Profº. Dr. Agenor Furigo Júnior

Pela orientação e conselhos na construção deste trabalho.

Carolina, Ana Paula, Giannini, Marcia e Jamile

Obrigada por estarem sempre por perto e não medirem esforços para me ajudar nos momentos mais críticos. Divido com vocês a vitória da finalização desta fase.

Aline, Luana, Bianca, Carla, Elias, Simone e Cláudia

Pela amizade e paciência, auxiliando-me com muitos dos resultados e experimentos utilizados neste trabalho.

A todos que trabalharam comigo no Laboratório de Biotecnologia e nos demais laboratórios de Ensino e no Engetec

Pela amizade e compreensão nos momentos em que não pude dar a atenção que esperavam de mim.

Aos membros da banca

Por aceitarem avaliar este trabalho, contribuindo com suas sugestões.

RESUMO

O uso de fontes renováveis de energia, entre as quais se destaca a energia de biomassa, é caracterizado por produzir menores impactos ambientais do que o uso de combustíveis fósseis. Os rejeitos e os resíduos agrícolas, por apresentarem quantidades significativas de carboidratos e em função da sua abundância e do seu caráter renovável, ocupam lugar de destaque entre as biomassas disponíveis no Brasil para aproveitamento energético. Na região nordeste da Santa Catarina, a biomassa da bananicultura tem sido avaliada como uma destas fontes, tanto para a geração de calor por combustão (briquetes) como para a produção de etanol de primeira (1G) e segunda geração (2G). Até o momento, para a obtenção de etanol, tem sido empregado o processo fermentativo descontínuo simples com uma única cultura microbiana (*Saccharomyces cerevisiae*). Este trabalho teve como objetivo produzir etanol de segunda geração a partir do pseudocaule de bananeira empregando cocultura microbiana e diferentes formas de condução de processo. Inicialmente foram realizados ensaios em batelada com monocultura de quatro diferentes espécies de micro-organismos mundialmente conhecidos como fermentadores de hexoses (*Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*) e pentoses (*Scheffersomyces stipitis* e *Pachysolen tannophilus*). A partir desses resultados pode-se concluir que todos são capazes de metabolizar aproximadamente 100 g/L de açúcares redutores em até 24 h e produzir em torno de 40 g/L de etanol, exceto *S. stipitis*. Nos ensaios em batelada repetida, o emprego da cocultura microbiana na fermentação de caldo de pseudocaule de bananeira previamente sacarificado, propiciou incremento na produtividade do processo batelada simples em torno de 23% em comparação ao mesmo tipo de processo empregando cada um dos micro-organismos avaliados (*S. cerevisiae* e *P. tannophilus*) de forma isolada. Não houve diferença significativa (Teste de Tukey para $p < 0,05$) entre os valores de rendimento e produtividade volumétrica em etanol obtidos nos ensaios de batelada repetida ao substituir-se diferentes volumes de caldo fermentado (40% e 60%) por igual volume de meio fresco (cortes). O processo de destoxificação do caldo de pseudocaule de bananeira com carvão ativo auxilia diminuindo a inibição do crescimento do micro-organismo. Tanto o aumento da concentração inicial de inóculo (3,0 g/L para 17 g/L) quanto o processo de operação por batelada sequencial, atuaram sinergicamente para o aumento da produtividade em etanol em torno de 60% quando comparado ao processo de batelada simples.

Palavras-chave: bioetanol, regime de operação, pseudocaule de bananeira.

ABSTRACT

The use of renewable energy sources, including biomass energy, is characterized by lower environmental impacts than the use of fossil fuels. Rejects and agricultural residues, because they present significant amounts of carbohydrates and due to their abundance and their renewable character, occupy a prominent place among the biomasses available in Brazil for energy use. In the northeast region of Santa Catarina, biomass of banana farming has been evaluated as one of these sources, both for the generation of heat by combustion (briquettes) and for the production of first (1G) and second generation (2G) ethanol. To date, the simple discontinuous fermentative process with a single microbial culture (*Saccharomyces cerevisiae*) has been used to obtain ethanol. This work aimed to produce second generation ethanol from the banana tree pseudostem using microbial co-culture and different forms of process conduction. Initially, batch trials with monoculture were carried out on four different species of microorganisms known worldwide as fermenters of hexoses (*Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*) and pentoses (*Scheffersomyces stipitis* and *Pachysolen tannophilus*). From these results it can be concluded that all are able to metabolize approximately 100 g/L reducing sugars in up to 24 h and produce around 40 g/L ethanol, except *S. stipitis*. In the repeated batch tests, the use of microbial co-culture in the fermentation of previously saccharized banana tree pseudostem broth, allowed an increase in the productivity of the simple batch process around 23% compared to the same type of process using each micro-Organisms (*S. cerevisiae* and *P. tannophilus*) in isolation. There was no significant difference (Tukey's test for $p < 0.05$) between the yield and volumetric productivity values in ethanol obtained in the repeated batch tests when different volumes of fermented broth (40% and 60%) were replaced by equal volume of fresh medium (cuts). The detoxification process of banana tree pseudostem broth with active charcoal aids in decreasing inhibition of microorganism growth. Both the increase in the initial inoculum concentration (3.0 g/L to 17 g/L) and the serial tanks operation, worked synergistically to increase productivity in ethanol by around 60% when compared to the batch.

Key-words: bioethanol, operating regime, banana tree pseudostem.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Matriz energética no Brasil (Fonte: EPE, 2014).....	33
Figura 02 -Matriz energética mundial (Fonte: EPE, 2014).....	34
Figura 03 -Estado atual e distribuição das reservas de petróleo no mundo (Fonte: BP – Brithish Petroleum (2007).....	35
Figura 04 - Prognóstico do consumo de energia em 2050 sem taxaço sobre emissão de carbono (Fonte: Yamamoto e Yamaji, 2005).....	38
Figura 05 - Evolução dos biocombustíveis no Brasil (Fonte: ANP, 2014).....	40
Figura 06 - Produção de Etanol 1G.....	43
Figura 07 - Produção de etanol 2G (Fonte: Hamelinck, 2005).....	43
Figura 08 - Forma de organização da biomassa lignocelulósica (Fonte: Cardenas, 2006).....	47
Figura 09 - Bananeira Musa ssp. (Fonte: Soffner, 2011).....	51
Figura 10 – Efeito do pré-tratamento no material lignicelulósico (Fonte: Mosier, 2005).....	56
Figura 11 – Produtos e subprodutos do pré-tratamento de material lignocelulósico (Fonte: Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000).....	56
Figura 12 – Diagramama de fluxo do processo de conversãode biomassa em etanol utilizando-se dentre várias etapas, a hidrólise enzimática (Fonte: Hahn-Hägerdal et al., 2007).....	61
Figura 13 - Processo SHF (Fonte: Balat et al., 2008).....	74
Figura 14 - Processo SSF (Fonte: Balat et al., 2008).....	75
Figura 15 - Custos de etanol 2G de 2005 à 2012 (Fonte: Sassner, 2007).....	80
Figura 16 - Fluxograma dos ensaios em frascos de Erlenmeyer com mosto sintético empregando diferentes monoculturas microbianas (EG) e cocultura (ECG) formada por micro-organismos selecionados em EG (Fonte: Primária, 2017).....	81
Figura 17 - Fluxograma dos ensaios com mosto proveniente de pseudocaule de bananeira sacarificado (Fonte: Primária, 2017).....	83
Figura 18 - Fotografia do equipamento cilindro para massas Hidro Industrial (Fonte: Primária, 2017).....	86
Figura 19 - Fotografia do equipamento secador de bandejas COEL HW 500 (Fonte: Primária, 2017).....	87
Figura 20 – Fotografia do farelo de biomassa de pseudocaule de bananeira (Fonte: Primária, 2017).....	87
Figura 21 – Licor não concentrado de pseudocaule de bananeira (Fonte: Primária, 2017)	89

Figura 22 – Licor concentrado de pseudocaule de bananeira (Fonte: Primária, 2017).....	90
Figura 23 – Conjunto de equipamentos para realização dos experimentos em biorreator de bancada 2L (Fonte: Primária, 2017).....	95
Figura 24 – Conjunto de equipamentos utilizados nos experimentos de batelada sequencial (Fonte: Primária, 2017).....	96
Figura 25 - Cinéticas de consumo de substrato (AR) e acúmulo de etanol (P) durante a fermentação descontínua simples (batelada) de mosto sintético contendo glicose (100 g/L) e cultivo com monocultura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26603 (EG1); <i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 3500 (EG2); <i>Scheffersomyces stipitis</i> ATCC 58376 (EG3); <i>Pachysolen tannophilus</i> ATCC 32691 (EG4).....	102
Figura 26 – Coeficiente de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e coeficiente de produtividade volumétrica em etanol (Q_P) obtidos na fermentação de mosto sintético por <i>S. cerevisiae</i> (EG1), <i>Z. mobilis</i> (EG2), <i>S. stipitis</i> (EG3) e <i>P. tannophilus</i> (EG4).....	103
Figura 27: Cinéticas de consumo de glicose (AR) e formação de produto (P) para o micro-organismo <i>S. cerevisiae</i> (1) para o cultivo com mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado não concentrado (AR = 50,0 g/L).....	105
Figura 28: Cinéticas de consumo de glicose (AR) e formação de produto (P) para o micro-organismo <i>S. cerevisiae</i> (1) para o cultivo com mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado concentrado (AR = 100,0 g/L).....	106
Figura 29: Cinética de consumo de substrato (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. tannophilus</i> na fermentação batelada em mosto sintético contendo 100 g/L de glicose.....	107
Figura 30: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. tannophilus</i> na fermentação batelada de mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado sem destoxificação.....	108
Figura 31: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. tannophilus</i> em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação batelada repetida com corte de 40% v/v.....	111
Figura 32: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. tannophilus</i> em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado	

empregando regime de operação batelada repetida com corte de 60% v/v.....	111
Figura 33: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana composta por 50% (em base de massa seca de células) de <i>S. cerevisiae</i> e 50% de <i>P. tannophilus</i> em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação batelada repetida com três cortes de 40% (C1, C2 e C3) do volume de trabalho.....	116
Figura 34: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana composta por 50% (em base de massa seca de células) de <i>S. cerevisiae</i> e 50% de <i>P. tannophilus</i> em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação batelada repetida com três cortes de 60% (C1, C2 e C3) do volume de trabalho.....	117
Figura 35: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana composta por 90% (em base de massa seca de células) de <i>S. cerevisiae</i> e 10% de <i>P. tannophilus</i> em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação batelada repetida com três cortes (C1, C2, C3) de 40% do volume de trabalho.....	118
Figura 36: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana composta por 90% (em base de massa seca de células) de <i>S. cerevisiae</i> e 10% de <i>P. tannophilus</i> em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação batelada repetida com três cortes (C1, C2, C3) de 60% do volume de trabalho.....	119
Figura 37: Comparativo dos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P dos ensaios EBR40 ₅₀ , EBR60 ₅₀ , EBR40 ₉₀ e EBR60 ₉₀	120
Figura 38: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana de <i>S. cerevisiae</i> (3,0 g/L) e <i>P. tannophilus</i> (3,0 g/L) em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação de batelada sequencial.....	124
Figura 39: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana de <i>S. cerevisiae</i> (17,0 g/L) e <i>P. tannophilus</i> (17,0 g/L) em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação de batelada sequencial.....	125
Figura 40: Comparativo dos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P dos ensaios BS1 e BS2.....	126

Figura 41: Curva de calibração da concentração celular de <i>S. cerevisiae</i> obtida das suspensões do inóculo a 570 nm.....	160
Figura 42: Curva de calibração da concentração celular utilizando <i>P. tannophilus</i> obtido das suspensões de inóculo a 570 nm.....	161
Figura 43: Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose pelo método DNS.....	162
Figura 44: Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de xilose pelo método DNS.....	163
Figura 45: Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose mais xilose pelo método DNS.....	164
Figura 46: Cinética de consumo de glicose (AR) e formação de etanol (P) por cocultura microbiana de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. tannophilus</i> em pH 4,0.....	165
Figura 47: Cinética de consumo de glicose (AR) e formação de etanol (P) por cocultura microbiana de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. tannophilus</i> em pH 5,0.....	167
Figura 48: Cinética de consumo de glicose (AR) e formação de etanol (P) por cocultura microbiana de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. tannophilus</i> em pH 6,0.....	167
Figura 49: Cromatograma da análise de açúcares.....	169
Figura 50: Cromatograma dos compostos ácido acético, açúcares e ácido láctico.....	170
Figura 51: Cromatograma do composto hidroximetilfurfural (HMF)..	171
Figura 52: Cromatograma do composto furfural.....	171

LISTA DE TABELAS QUADROS

Tabela 01: Composição percentual de celulose, hemicelulose e lignina de diversos tipos de biomassa.....	48
Tabela 02: Trabalhos cinéticos com resíduos lignocelulósicos (Fonte: Primária, 2017).....	49
Tabela 03: Composição percentual de celulose, hemicelulose e lignina dos resíduos da bananicultura (Fonte: Primária, 2017).....	53
Tabela 04: Composição de diferentes concentrações de ácido sulfúrico diluído, temperatura e tempo de reação no pré-tratamento de várias biomassas lignocelulósicas avaliadas por diferentes autores (Fonte: Hopfner, 2015).....	59
Tabela 05: Inibidores do metabolismo microbiano de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Scheffersomyces (Pichia) stipitis</i> resultantes do processo de pré-tratamento de biomassa (Fonte: Primária, 2017).....	64
Tabela 06: Fatores químicos, físicos e microbiológicos que afetam a fermentação (Fonte: Lima <i>et al</i> , 2001).....	69
Tabela 07: Teores de celulose (cel), hemicelulose (hemi) e lignina (lig) em diferentes tipos de biomassa lignocelulósica.....	85
Tabela 08: Meios de cultivo sintético para os micro-organismos avaliados (Fonte: Primária, 2017).....	91
Tabela 09: Comparativo entre valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de diversos autores e fontes de biomassa.....	110
Tabela 10: Valores de t_f , P_f , $Y_{P/S}$ e Q_P para os ensaios ECP, EBR60 e EBR60 ₅₀	121
Tabela 11: Valores de t_f , P_f , $Y_{P/S}$ e Q_P para os ensaios ECP, EBR60 ₅₀ e BS2.....	127
Tabela 12: Valores de massa úmida e massa seca de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 23606 utilizando meio de S.c. após inoculação de 48 h a 30 °C.....	159
Tabela 13: Dados experimentais obtidos na construção da curva de calibração da concentração celular.....	159
Tabela 14: Valores de absorbância de suspensões de <i>P. tannophilus</i> utilizando meio de P.t. após inoculação de 48 h a 30 °C.....	160
Tabela 15: Valores de absorbância a 540 nm de amostras em diferentes concentrações de glicose para construção da curva de calibração.....	162
Tabela 16: Valores de absorbância a 540 nm de amostras em diferentes concentrações de xilose para construção da curva de calibração.....	163
Tabela 17: Valores de absorbância a 540 nm de amostras em diferentes concentrações de glicose e xilose para construção da curva de calibração.....	164

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Principais matérias-primas para obtenção de etanol de origem agrícola.....	41
Quadro 02: Custos da produção de etanol 2G (por litro).....	79
Quadro 03: Condições de cultivo dos ensaios EG1 a ECP.....	82
Quadro 04: Condições de cultivo dos ensaios EBR40 a BS2.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2G – Etanol de segunda geração
ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica
ANP – Agência Nacional de Petróleo
AR – Açúcar redutor
AR₀ – Concentração de açúcar redutor no início da fermentação (g/L)
AR_f – Concentração de açúcar redutor no fim da fermentação (g/L)
ART – Açúcares redutores totais
ATR – Açúcares totais recuperáveis
ATCC – American Type Culture Collection
Bioetanol – etanol de segunda geração
BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
BS1 – Ensaio em batelada sequencial com 3,0 g/L de concentração de inóculo
BS2 - Ensaio em batelada sequencial com 17,0 g/L de concentração de inóculo
C1 – corte 1
C2 – corte 2
C3 – corte 3
CENBIO – Centro Nacional de Referência em Biomassa
CEPA - Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola
CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Biotecnologia do Bioetanol
CG - Cromatografia gasosa
DNS – Ácido 3 5-dinitrosalicílico
ECG – Ensaio em batelada simples com glicose
ECP – Ensaio em batelada simples com pseudocaule
EG1 – Ensaio com glicose e *S. cerevisiae*
EG2 - Ensaio com glicose e *Z. mobilis*
EG3 - Ensaio com glicose e *P. stipitis*
EG4 - Ensaio com glicose e *P. tannophilus*
EJ - Exajoule
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EBR40 - Ensaio em batelada repetida com corte de 40%
EBR60 - Ensaio em batelada repetida com corte de 60%
EBR40₅₀ - Ensaio em batelada repetida com corte de 40% com proporção celular 50:50
EBR60₅₀- Ensaio em batelada repetida com corte de 60% com proporção celular 50:50

EBR40₉₀ – Ensaio em batelada repetida com corte de 40% com proporção celular 90:10

EBR60₉₀ – Ensaio em batelada repetida com corte de 60% com proporção celular 90:10

EPE – Empresa de Pesquisa Energética

FAO – Organização das Nações Unidas Para a Agricultura e Alimentos

GEE – Gases de efeito estufa

GY – Meio de cultivo sintético contendo glicose e extrato de levedura

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IPE – Analisador de Processos Icarus

MCT – Ministério da Ciência e Tecnologia

MMA – Ministério do Meio Ambiente

MME – Ministério Minas Energia

m/ms – Massa por massa seca

m/v – Massa por volume

ms – Massa seca

mu – Massa úmida

OIE – Oferta Interna de Energia

ONU – Organização das Nações Unidas

P – Concentração de etanol (g/L)

P_f - Concentração de etanol no tempo final de fermentação (g/L)

P₀ - Concentração de etanol no início do processo fermentativo (g/L)

pH – Potencial hidrogeniônico

PIB – Produto Interno Bruto

Proálcool - Programa Nacional do Álcool

Q_P - Produtividade volumétrica em etanol (g/(L.h))

r² – Coeficiente de correlação linear

rpm – Rotações por minuto

S – Concentração de substrato (g/L)

S₀ – Concentração inicial de AR (g/L)

S_f – Concentração final de AR (g/L)

SHF – Hidrólise e Fermentação Separadas

SSF – Sacarificação e Fermentação Simultâneas

S-SSF – Sacarificação de Fermentação Semi-Simultâneas

t_f - tempo final de fermentação (h)

X₀ – Concentração de inicial de micro-organismos (g/L)

X_f – Concentração de final de micro-organismos (g/L)

Y_{P/S} – Fator de conversão de substrato em produto (g/g)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	31
2.1 Fontes de energia.....	32
2.2 Biomassa.....	36
2.3 Biocombustíveis.....	39
2.4 Bioetanol.....	40
2.5 Resíduos lignocelulósicos.....	46
2.6 Resíduos da bananicultura.....	50
2.7 Tecnologias de conversão de biomassa lignocelulósica em etanol 2G.....	54
2.7.1 Pré-tratamento físico.....	54
2.7.2 Pré-tratamento físico-químico.....	55
2.7.3 Pré-tratamento químico.....	57
2.7.4 Pré-tratamento enzimático.....	61
2.7.5 Formação de compostos inibidores.....	62
2.8 Processo Fermentativo.....	65
2.8.1 Micro-organismos.....	66
2.8.2 Fatores que afetam a fermentação.....	68
2.8.3 Formas de condução da fermentação.....	70
2.8.4 Outros Processos.....	76
2.9 Aspectos econômicos da produção de etanol 2G.....	78
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	81
3.1 Biomassa.....	85
3.1.1 Pré-tratamento químico.....	88
3.1.2 Sacarificação.....	88
3.1.3 Filtração e concentração do caldo sacarificado.....	88
3.1.4 Destoxificação.....	90
3.2 Micro-organismos e manutenção.....	90
3.3 Ensaios de fermentação.....	91
3.3.1 Preparo do inóculo.....	91
3.3.2 Mosto sintético.....	92

3.3.3 Mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado.....	93
3.3.4 Ensaios em Batelada	93
3.3.4.1 Mosto sintético.....	93
3.3.4.2 Mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado.....	94
3.3.5 Ensaios em Batelada Repetida.....	94
3.3.5.1 Em frascos de Erlenmeyer.....	94
3.3.5.2 Em reator.....	94
3.3.6 Ensaios em batelada sequencial.....	95
3.4 Métodos Analíticos	97
3.4.1 Determinação de (AR).....	97
3.4.2 Determinação de Etanol.....	97
3.4.3 Cálculo dos parâmetros cinéticos de fermentação.....	98
3.4.5 Análises estatísticas.....	99
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101
4.1 Fermentação por monocultura em batelada simples.....	101
4.2 Fermentação com cocultura em processo batelada simples.....	106
4.3 Fermentação alcoólica por monocultura em bateladas repetidas.....	110
4.3.1 Ensaios com mosto sacarificado de pseudocaule em frascos de Erlenmeyer.....	110
4.3.2 Ensaios em biorreator com mosto de pseudocaule destoxificado.....	114
4.4 Fermentação alcoólica por cocultura de leveduras em batelada sequencial.....	114
CONCLUSÕES.....	129
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	131
REFERÊNCIAS	133
APÊNDICES.....	159

1. INTRODUÇÃO

A utilização intensiva de combustíveis fósseis como fonte de energia, considerada uma das principais responsáveis pela emissão de Gases de Efeito Estufa (GEE) e consequente aquecimento global, levou a uma diminuição considerável das reservas mundiais com prognósticos do seu esgotamento no próximo século. Fontes alternativas de energia como a solar, eólica, hidráulica e de biomassa têm sido empregadas no mundo todo. Dentre estas fontes, a biomassa é a única que possui a flexibilidade de ser utilizada na geração de energia elétrica através da sua combustão ou como matéria-prima na produção de biocombustíveis (biogás, biodiesel ou bioetanol).

No processo de obtenção do bioetanol, micro-organismos fermentadores são capazes de converter os açúcares de materiais lignocelulósicos a etanol. No entanto, para a produção de etanol de segunda geração (Etanol 2G), a biomassa lignocelulósica necessita, primeiramente, ser submetida ao processo de sacarificação antes da fermentação alcoólica. Entende-se como sacarificação a quebra dos polímeros celulose e hemicelulose nos seus principais monômeros de glicose e xilose, respectivamente. A glicose é facilmente metabolizada pela maioria dos micro-organismos fermentadores enquanto que a oxidação da xilose é realizada por um pequeno grupo de micro-organismos produtores de etanol (SURIYACHAI et al., 2013; TRAN et al., 2013).

Há desafios técnicos para tornar o etanol 2G economicamente viável e competitivo frente a outros combustíveis, principalmente com o etanol de primeira geração (Etanol 1G: etanol de caldo de cana-de-açúcar, milho ou beterraba). O principal desafio é a conversão dos resíduos ou rejeitos agroindustriais em açúcares fermentescíveis e em etanol com elevados rendimentos e baixos custos. Outro é possibilitar que os micro-organismos fermentadores possam converter todos os açúcares contidos na matéria-prima, principalmente as hexoses e pentoses, em etanol, com produtividade próxima a dos processos etanol 1G. Dessa maneira, diversos estudos abrangem linhas de pesquisas que contribuem para a otimização da geração de etanol 2G a partir de biomassa vegetal como a Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SFS) com micro-organismo modificado geneticamente e aumento da eficiência da hidrólise por meio de irradiação ultrassom (KARIMI et al., 2014), otimização da hidrólise enzimática por meio de metodologia de superfície de resposta (RSM) (DAS et al., 2015). Entretanto, muitas

vezes, os estudos de otimização da produção de etanol 2G não se tornam economicamente viáveis.

A utilização da biomassa vegetal é favorável pela abundância que apresenta no mundo todo. No Brasil, em especial no Estado de Santa Catarina, o aproveitamento energético pode ser obtido a partir da cultura de banana que, conforme dados do Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola de Santa Catarina (CEPA, 2016), na safra de 2014/2015, o estado foi responsável por 735,1 mil toneladas, destacando-se ainda como o quarto maior produtor de bananas do Brasil. Por região, o Litoral Norte do Estado é responsável por 85% dessa produção. Considerando a produção anual da região em torno de 552,16 mil toneladas e tomando como base a quantidade de biomassa produzida por tonelada de fruta (SOUZA et al., 2010) pode-se estimar a geração de 2,2 milhões de toneladas (em massa úmida) de resíduos vegetais (cascas, engaços, folhas e pseudocaules). O pseudocaulo representa 75% de toda essa biomassa.

Vários estudos realizados pelo grupo de pesquisa “Valorização de Resíduos e Biomassa” da Univille (GONÇALVES FILHO et al., 2013; JUST et al. 2015; SOUZA et al. 2013, 2014a, 2014b), demonstraram a potencialidade do uso do pseudocaulo da bananeira para a produção de etanol 2G. Até o momento foram avaliadas: a influência de diferentes técnicas de pré-tratamento da biomassa (secagem, cominuição, hidrólise alcalina e hidrólise ácida), diferentes condições operacionais de hidrólise enzimática e o uso de diferentes espécies de micro-organismos sobre o rendimento e produtividade em etanol. Porém, em todos esses estudos onde o processo fermentativo usado foi sempre o descontínuo simples (processo batelada) onde a concentração máxima de etanol alcançada no caldo fermentado foi de 40g/L (JUST et al. 2015).

Este trabalho buscou uma forma de aumentar a produção de etanol sem, contudo, reduzir o rendimento e a produtividade do processo. Portanto, o objetivo principal foi produzir etanol de segunda geração a partir do pseudocaulo de bananeira empregando cocultura microbiana e diferentes formas de condução de processo fermentativo de forma a obter concentração do produto de até 80 g/L no caldo fermentado. Como objetivos específicos teve-se:

1. Avaliar a produção de etanol específica para quatro diferentes micro-organismos (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603, *Zymomonas mobilis* ATCC 35001, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* ATCC 58376 e

Pachysolen tannophilus ATCC 32691) empregando mosto sintético (fonte de carbono: glicose);

2. Avaliar a produção de etanol 2G pelos mesmos micro-organismos empregando como fonte de carbono dois mostos de pseudocaule da bananeira sacarificado (não destoxificado e destoxificado) e mostos sintéticos (fonte de carbono: glicose);
3. Selecionar dentre os micro-organismos avaliados duas espécies para compor cocultura e verificar a influência da concentração de açúcares redutores de pseudocaule de bananeira sobre a produtividade volumétrica em etanol (fermentação batelada simples);
4. Verificar a influência da concentração de açúcares redutores em mosto de pseudocaule sobre a produtividade volumétrica em etanol empregando a fermentação batelada simples com cocultura microbiana;
5. Estabelecer a influência da concentração inicial de inóculo (cocultura microbiana, processo batelada simples) sobre a produtividade em etanol 2G;
6. Produzir etanol 2G empregando diferentes formas de condução do processo fermentativo (batelada repetida e bateladas sequenciais) visando aumentar a produtividade do processo em comparação à batelada simples.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O aproveitamento de diferentes biomassas vegetais como fontes de energia, embora não venha substituir o petróleo em sua totalidade, contribuirá para diminuir a utilização de combustíveis fósseis com consequente redução dos impactos negativos ao ambiente causados pelo seu consumo.

A baixa eficiência no processo de queima dos combustíveis fósseis para geração de energia motora, promove a emissão de grandes quantidades de poluentes na atmosfera, incluindo os Gases de Efeito Estufa (GEE) e, principalmente, dióxido de carbono (CO₂). Como resultado do aumento de emissão dos GEE, tem-se observado mudanças climáticas, como o aquecimento global, que estão provocando alterações significativas nos ecossistemas. Estima-se como suas consequências diretas aproximadamente 150 mil mortes adicionais por ano, um risco crescente de fome para milhões de pessoas, enchentes e escassez de água, além do aumento da incidência de doenças, como por exemplo, a malária (TESKE e SCHÄFER, 2007). Preocupações com a sustentabilidade e o meio ambiente tornam a obtenção de energia renovável uma importante estratégia para as nações de todo mundo. Ao mesmo tempo em que se busca ampliar a oferta desta energia deve-se pensar em processos de baixo custo.

Em função do estado de Santa Catarina gerar grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos na indústria da bananicultura, a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) vem estudando, desde 2007, formas de converter esses resíduos em etanol 2G.

Schulz (2010) ao pré-tratar com ácido e, posteriormente, hidrolisar com enzimas casca de banana *Musa cavendishii* na concentração de 250 g/L em massa úmida (mu), obteve 5,77 g/L de açúcares redutores (AR) no caldo, esse valor representou um rendimento em AR de 2,31%. Em seguida, ao fermentar por *Saccharomyces cerevisiae* meio reacional contendo 1210 g/L de casca de banana *in natura* (19,51 g/L de AR) obteve concentração de etanol (Pf), fator de conversão de substrato em etano (YP/AR) e produtividade (QP) de 7,88 g/L, $0,34 \pm 0,11$ g/g e $1,32 \pm 0,03$ g/L.h respectivamente. Gonçalves Filho (2011), avaliou diferentes processos de despolimerização do pseudocaule de bananeira *Musa cavendishii* sobre a fermentação alcoólica. Nesse estudo, o autor obteve melhor resultado no rendimento em açúcares redutores com base no teor de celulose da biomassa (RAR = $74,1 \pm 11,4\%$) quando empregou, sobre o pseudocaule, pré-tratamento alcalino e,

posteriormente, lavagem com água e hidrólise enzimática. Na fermentação, por *Saccharomyces cerevisiae*, do caldo hidrolisado de pseudocaule, cujo processo hidrolítico ocorreu por ácido com 500 gmu/L (23,5 gms/L) de pseudocaule pré-tratado em meio alcalino, obteve um fermentado com aproximadamente 7 g/L de etanol, e os parâmetros fermentativos YP/AR e QP foram de $0,31 \pm 0,01$ g/g e $0,90 \pm 0,09$ g/L.h respectivamente. Hopfner (2015) ao avaliar a produção de etanol por diferentes espécies de micro-organismos a partir de mostos de cascas de banana (frescas ou sacarificadas) com diferentes concentrações de açúcares redutores, identificou que o caldo concentrado (AR $\cong 100$ g/L) de casca *in natura* de banana fermentado por *S. cerevisiae* ATCC 26603, proporcionou, após 24 h de fermentação, um vinho com 32,4 g/L de etanol, resultando em YP/AR de $0,44 \pm 0,01$ g/g e QP de $1,31 \pm 0,01$ g/L.h.

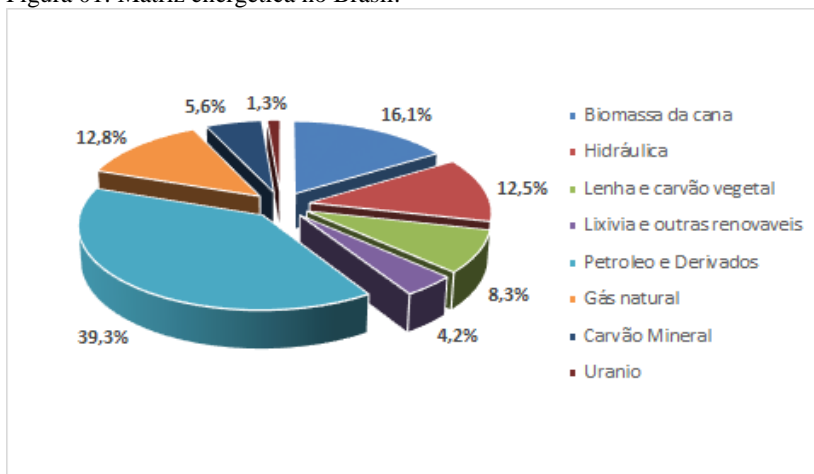
Souza (2015) ao realizar simulação, em *software* Aspen Hysys®, do processo de produção de etanol a partir de resíduos da bananicultura (Figura 13), indicou que para a produção de etanol em escala industrial, com consumo de energia próximo dos valores propostos pela literatura, são necessários 9046 ton/h de pseudocaule seco, 52,33 ton/h de casca, e 1,58 ton/h de fruto rejeitado para se obter 270 ton/h de mosto, com esses valores foi possível obter, pela simulação, vazões de etanol hidratado e anidro da ordem de 23,52 ton/h e 21,97 ton/h, com frações mássicas de etanol de 93,50 % e 99,50. Até o momento foram avaliadas: a influência de diferentes técnicas de pré-tratamento da biomassa (secagem, cominuição, hidrólise alcalina e hidrólise ácida), diferentes condições operacionais de hidrólise enzimática e o uso de diferentes espécies de micro-organismos sobre o rendimento e produtividade em etanol. Porém, em todos esses estudos onde o processo fermentativo usado foi sempre o descontínuo simples (processo batelada) onde a concentração máxima de etanol alcançada no caldo fermentado foi de 40g/L (JUST et al. 2015). Neste capítulo, estão apresentados estudos realizados por outros pesquisadores e grupos de pesquisa a fim de fundamentar o tema da tese.

2.1 Fontes de Energia

A matriz energética brasileira está dividida em dois grandes grupos: energia proveniente de fontes fósseis, que correspondem a 58% da energia consumida no país, e a energia de fontes alternativas, sendo que a maioria desta última são renováveis. No Brasil, as fontes renováveis de energia representam 41% da matriz energética. Dessas,

12,5% correspondem à energia hidráulica e 16,1%, à energia de biomassa (EPE, 2014), o que torna a matriz energética predominantemente de origem renovável (Figura 01).

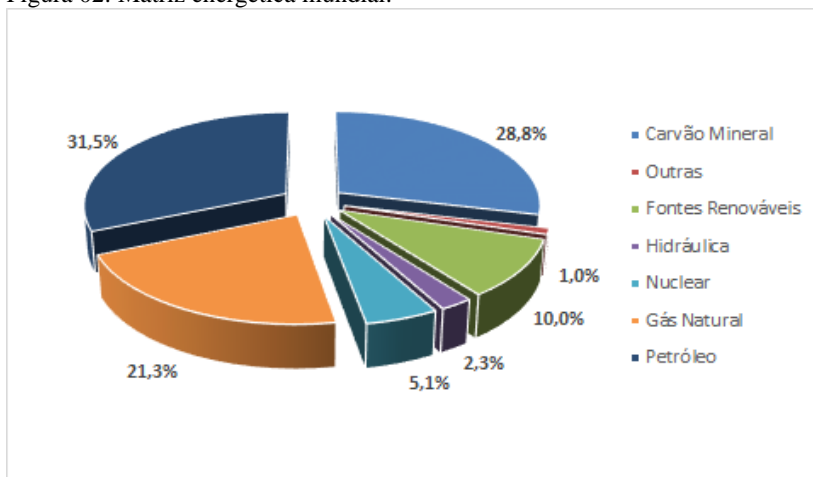
Figura 01: Matriz energética no Brasil.



Fonte: EPE (2014).

Na Figura 02 é apresentada a matriz energética mundial, onde grande parte da energia utilizada é proveniente de recursos não renováveis e, apenas, 10% são de fontes renováveis. Quando se faz uma comparação entre a matriz energética mundial e a do Brasil, percebe-se que a matriz energética brasileira é bastante limpa.

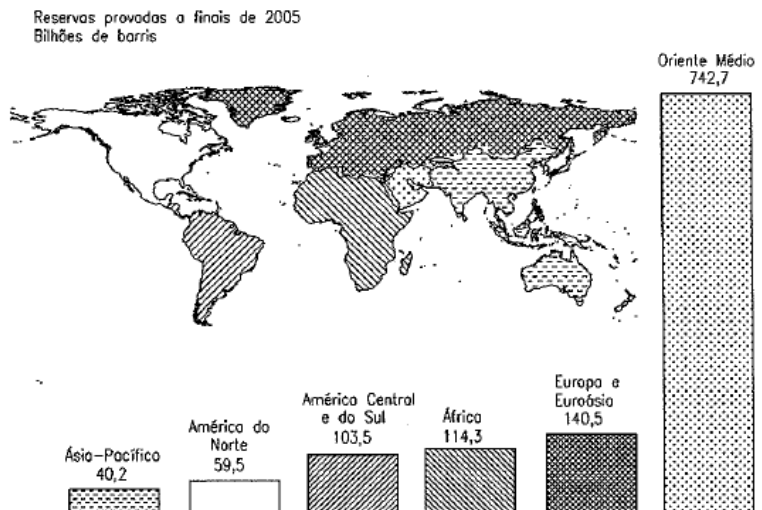
Figura 02: Matriz energética mundial.



Fonte: EPE (2014).

As reservas mundiais de petróleo estão distribuídas de maneira extremamente irregular. O Oriente Médio concentra cerca de 65% das reservas mundiais, enquanto a Europa e a Eurásia respondem por 11,7%, a África 9,5%, as Américas Central e do Sul 8,6%, a América do Norte 5%, e a Ásia e o Pacífico 3,4% (Figura 03) (BP, 2015).

Figura 03: Estado atual e distribuição das reservas de petróleo no mundo.



Fonte: BP – British Petroleum (2015).

A utilização intensiva e pouco eficiente dos combustíveis fósseis para o suprimento das necessidades energéticas da humanidade, levou a uma diminuição considerável de suas reservas mundiais e a prognósticos do seu esgotamento nas próximas décadas. Este fenômeno conhecido como *peak-oil*, é caracterizado pela redução na produção mundial de petróleo iniciado a partir de 2010. Esta situação teve como consequências um aumento de preço dos barris de petróleo, uma maior frequência e intensidade dos conflitos bélicos e uma considerável preocupação dos governos em garantir a segurança energética dos países consumidores. É unânime a opinião de que a era da energia barata já está ultrapassada (LORA e VENTURINI, 2012).

A resposta do Brasil para o declínio da extração de petróleo, remonta à época do “Primeiro Choque do Petróleo” em 1973, com o lançamento do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) pelo governo brasileiro em novembro de 1975. O Proálcool tinha por objetivo a substituição da gasolina pelo álcool em veículos automotivos, em larga escala, o qual foi intensificado com o advento do “Segundo Choque do Petróleo” em 79/80, substituindo no segmento de transporte veicular leve, a gasolina consumida impactando positivamente a economia brasileira (TORRES *et al.*, 2010).

Atualmente, o estado de São Paulo é o maior produtor de etanol no Brasil e o segundo maior produtor mundial, atrás apenas dos EUA, com ¼ da produção mundial de etanol. Desde a safra 2013/14, as usinas brasileiras têm destinado mais Açúcares Totais Recuperáveis (ATR) para etanol do que para açúcar, revertendo uma tendência observada a partir da safra 2009/10. Na safra 2015/16, aproximadamente 60% do ATR foi destinado ao etanol. Esta tendência ainda é observada na safra 2016/2017 onde a produção acumulada de açúcar alcançou 35,25 milhões de toneladas, enquanto que a fabricação de etanol no mesmo período totalizou 25,02 bilhões de litros, com 10,57 bilhões de etanol anidro e 14,45 bilhões de hidratado (MAPA, 2016). Aspectos como variedades altamente selecionadas, processos industriais sofisticados, clima e possibilidade de terras agricultáveis garantem ao Brasil uma liderança confortável na tecnologia de produção de etanol. Entretanto, para preservar esta posição num cenário competitivo, o Brasil precisa manter investimentos compatíveis na geração de novas tecnologias e formação de competências. A conversão de material lignocelulósico ou biomassa em açúcares fermentáveis para produção de etanol vem sendo considerada como uma alternativa promissora para aumentar a produção de etanol necessária para atender à demanda mundial (BUCKERIDGE, 2013).

2.2 Biomassa

O Brasil possui condições naturais e geográficas favoráveis à produção de biomassa, pois recebe uma intensa radiação solar ao longo do ano, possui uma grande quantidade de terra agricultável, com boas características de solo e condições climáticas favoráveis. Estas condições são favoráveis à produção de biomassa, quer seja para alimentação ou para fins agroindustriais. Assim, o país pode assumir posição de destaque no cenário mundial na produção e no uso da biomassa como recurso energético (MMA, 2014).

Do ponto de vista da geração de energia, o termo biomassa abrange os derivados recentes de organismos vivos utilizados como combustíveis ou para a sua produção. Do ponto de vista da ecologia, biomassa é quantidade total de matéria viva existente num ecossistema ou numa população animal ou vegetal. Os dois conceitos estão interligados embora sejam diferentes. Na definição de biomassa para geração de energia excluem-se os tradicionais combustíveis fósseis, pois embora estes também sejam derivados da vida vegetal (carvão mineral) ou animal (petróleo e gás natural), são resultado de várias

transformações que requerem milhões de anos para acontecerem. Nestes termos, pode-se considerar a biomassa um recurso natural renovável, enquanto que os combustíveis fósseis não se renovam a curto prazo (ANEEL, 2008).

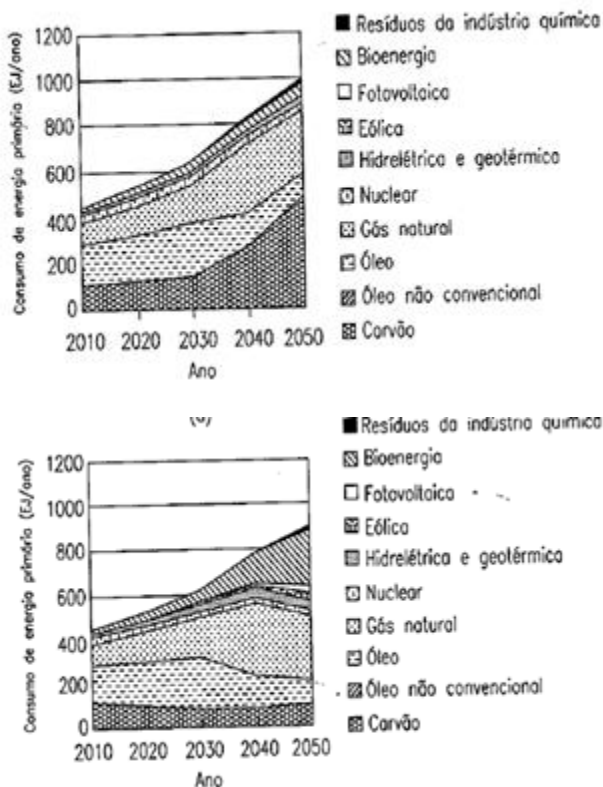
De acordo com vários autores (BALAT e AYAR, 2005; McKENDRY, 2002), a biomassa encontra-se entre 6 a 14% do total de energia primária consumida no mundo. Até 2021, os estudos do Ministério de Minas Energia (MME) mostram a manutenção da participação das fontes renováveis na matriz de Oferta Interna de Energia (OIE), acima de 44%, ficando a biomassa com percentuais superiores a 30%. Em 2021, especificamente, a biomassa chegará a 32,4% de participação (ANP, 2016).

O uso energético da biomassa é baseado na utilização de resíduos primários (resíduos agrícolas e florestais), secundários (indústrias madeireiras, moveleira, resíduos de processamento de alimentos, da produção de carvão vegetal, da criação de animais, etc) e terciários (decorrentes do consumo de alimentos e materiais), assim como da biomassa gerada diretamente para esta finalidade em plantações energéticas (HOOGWIJK et al., 2003).

Hoogwijk et al. (2003), avaliaram que o potencial de bioenergia em 2050 estará compreendido na faixa de 33 até 1130 EJ/ano. Um estudo realizado por Berndes et al. (2003), que utilizaram outros 17 estudos diferentes como base, indicou um potencial equivalente a 20% do consumo total de energia no mundo a ser fornecido pela biomassa. Segundo Sims *et al.* (2007) em 2030 serão utilizados 61,20 EJ/ano de energia da biomassa. Estudos relatam que no futuro o potencial de bioenergia será, no mínimo, maior ou igual ao atual consumo de energia primária global.

De acordo com Yamamoto e Yamaji (2005) a implementação de taxas pelo carbono emitido incentivaria o uso energético da biomassa. Nas Figuras 04 (a) e (b) é mostrado um prognóstico de consumo de energia primária no mundo do ano de 2010 até o ano de 2050. Os autores simularam dois cenários para o consumo de energia em 2050: o primeiro sem nenhum tipo de taxa sobre a emissão de carbono e o segundo com uma taxa de US\$ 400,00 por tonelada de carbono emitido.

Figura 04: Prognóstico do consumo de energia para 2050 sem taxaço (a) e com elevada taxaço (b) sobre emissão de carbono.



Fonte: Yamamoto e Yamaji (2005).

No caso de não haver taxaço sobre as emissões de carbono (Figura 04a), o fornecimento estimado de bioenergia será de 59 EJ/ano em 2050, sendo constituído por 53 EJ/ano de resíduos de biomassa e 6 EJ/ano provenientes de plantações de culturas energéticas. Quando se analisa a situação global de produção de energia com taxaço sobre a emissão de carbono (Figura 04b), a previsão é que a bioenergia represente 253 EJ/ano em 2050, e os resíduos de biomassa para 79 EJ/ano. Neste caso, as culturas energéticas produzidas através de excedentes de solos cultiváveis serão constantes e fornecerão em torno de 6 EJ/ano, em ambos os casos.

2.3 Biocombustíveis

O termo biocombustíveis é designado aos combustíveis líquidos ou gasosos utilizados no setor de transportes que são produzidos predominantemente de biomassa. Oferecem muitas vantagens, incluindo sustentabilidade, redução da emissão de gases, desenvolvimento regional, social e agrária e segurança de suprimento (REINJEDERS, 2006).

Os biocombustíveis são renováveis, uma vez que são produzidos a partir de resíduos de culturas agrícolas, tais como cana-de-açúcar, plantas oleaginosas, biomassa florestal e outras fontes de matéria orgânica. Como exemplos pode-se citar o biodiesel, etanol, metanol e gás metano. Podem ser usados tanto individualmente quanto adicionados aos combustíveis convencionais em misturas (LORA, 2012).

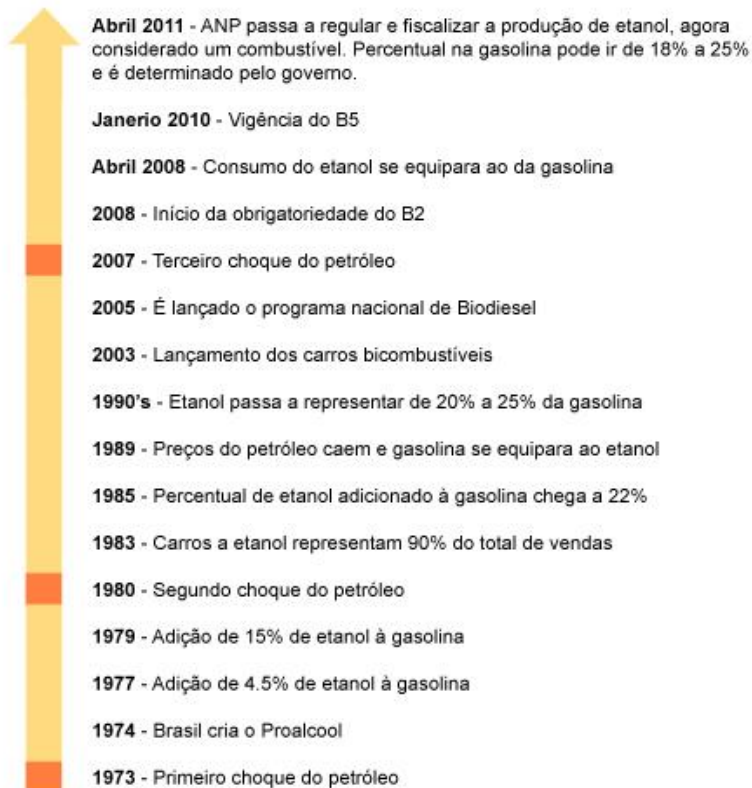
Para serem classificados como combustível renovável, biocombustível avançado ou biocombustível celulósico, devem apresentar percentuais mínimos de redução de GEE ao longo de seus ciclos de vida em comparação com as emissões da gasolina e do diesel (RODRIGUES, 2011). Em fevereiro de 2010, a Environmental Protection Agency (EPA) - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, designou o etanol de cana-de-açúcar como biocombustível avançado, capaz de reduzir as emissões de gases de efeito estufa em pelo menos 61% quando comparado com a gasolina.

Algumas vantagens dos biocombustíveis em comparação aos combustíveis fósseis são: fechamento do ciclo do carbono, contribuindo para a estabilização deste gás na atmosfera; grandes áreas para cultivo de plantas que podem ser usadas como biocombustíveis, no caso do Brasil; geração de emprego e renda no campo; maior investimento financeiro em pesquisas; o biodiesel substitui bem o óleo diesel sem necessidade de ajustes no motor; redução de resíduos no planeta e manuseio e armazenamento mais seguros. Entre as desvantagens pode-se relacionar o consumo de energia e água, assim como os problemas relacionados à contaminação do solo e lençóis freáticos devido ao uso de fertilizantes (RODRIGUES, 2011).

Os mais recentes desenvolvimentos no setor de biocombustíveis, com base no exemplo da produção do etanol e biodiesel, demonstram que o Brasil está em um processo abrangente de transformação, conduzindo a enormes consequências econômicas, associadas a mudanças na política interna, gerando mudanças sociais,

socioculturais e ecológicas (KOHLHEEP, 2010). Na Figura 05 é mostrado a evolução dos biocombustíveis no Brasil (ANP, 2014).

Figura 05: Evolução dos biocombustíveis no Brasil.



Fonte: ANP (2014).

2.4 Bioetanol

Os álcoois são substâncias neutras, derivadas de hidrocarbonetos, com a substituição de um ou mais átomos de hidrogênio por um ou mais grupos hidroxila (OH). Diferentes misturas de gasolina e etanol são utilizadas em veículos fabricados para funcionar com gasolina, porém são requeridas modificações no motor uma vez que as propriedades do álcool combustível são diferentes da gasolina. O álcool etílico tem algumas desvantagens em relação à gasolina, entre estas está um menor poder calorífico, o que aumenta seu consumo

específico. Porém, devido a sua alta octanagem, o álcool pode ser utilizado em motores com taxa de compressão elevada, o que se traduz em aumento de potência (LORA, 2012).

O etanol ou álcool etílico (C_2H_5OH) é produzido desde os tempos antigos pela fermentação e, ainda hoje, grande parte do etanol industrial é obtido pelo mesmo processo, embora também possa ser produzido a partir de eteno, derivado do petróleo (BASTOS, 2007).

Para a obtenção de etanol por fermentação as principais matérias-primas são de origem agrícola. Friedich (1999) as agrupa em três grandes grupos: açucaradas, amiláceas e celulósicas (Quadro 01).

Quadro 01: Principais matérias-primas para obtenção de etanol de origem agrícola.

Açucaradas	Mosto de suco de diferentes frutas Beterraba e cana-de-açúcar Sorgo açucarado	
Amiláceos	Cereais	Milho
		Cevada
		Malte
		Trigo
		Aveia
		Centeio
	Tubérculos	Arroz
		Batata
		Batata-doce
Celulósicos	Raiz de girassol	
	Madeira	
	Bagaço e palha de cana-de-açúcar	
	Palha de trigo	
	Resíduos de milho	
Polpa de beterraba		

Fonte: Friedich (1999).

Diferentes tipos de matérias-primas são utilizados em diferentes países para a obtenção de etanol, atendendo à disponibilidade de cultivos e condições climáticas, que favorecem o crescimento e produtividade de culturas agrícolas diversas. Nos principais países produtores de etanol utilizam-se como matérias-primas, a cana-de-açúcar na Índia e no Brasil; o milho nos Estados Unidos, a beterraba

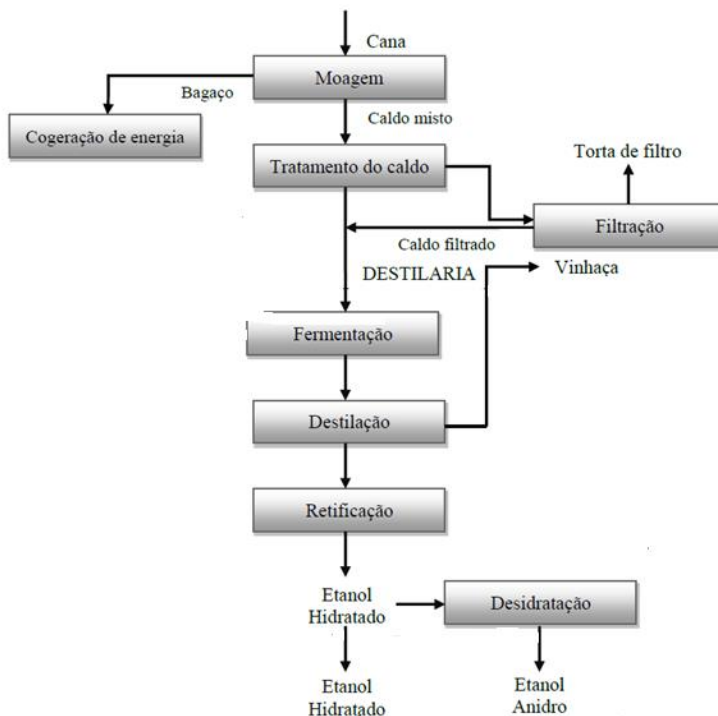
açucareira, o sorgo açucareiro e o trigo na União Europeia e a cana-de-açúcar e milho na China (LORA, 2012). Conforme dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016), nos últimos três anos a produção anual brasileira de etanol foi de, aproximadamente, 30 milhões de litros.

De acordo com Finguerut et al. (2008), embora o monossacarídeo seja o componente mais importante na composição de uma matéria-prima a ser usada no processo industrial de fermentação, vários outros parâmetros têm de ser levados em conta, tais como: teor de água (que tem influência sobre a concentração de carboidratos); tipos de carboidratos que estão presentes e em que proporção; teor de macro e micronutrientes, principalmente nitrogênio, fósforo, magnésio, zinco e manganês; fatores de crescimento, como vitaminas, que precisam estar presentes em concentrações mínimas; pH e poder tamponante do substrato a ser utilizado; teor de sólidos insolúveis (indesejável na maioria dos casos); presença de compostos tóxicos ou inibidores da fermentação alcoólica; entre outros. O teor total de sais (como os de potássio, sódio ou cálcio) também tem um limite superior, pois o efeito deletério promove um aumento da pressão osmótica.

Para avaliar o processo de produção de etanol, as indústrias brasileiras têm utilizado o conceito de produtividade agroindustrial em etanol, a qual engloba a produtividade da cana no campo e a produtividade industrial na obtenção do etanol. Alguns autores têm demonstrado uma produtividade agroindustrial máxima de 8.000 a 8.500 litros de etanol por hectare de solo cultivado (GOLDEMBERG, 2010; PALÁCIO et al., 2012).

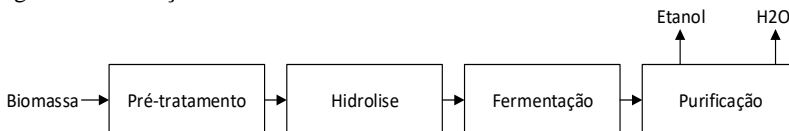
Enquanto as tecnologias para a produção de etanol de primeira geração (etanol 1G) estão baseadas na fermentação alcoólica dos carboidratos (principalmente sacarose e amido) presentes na matéria-prima, para a produção do etanol de segunda geração (etanol 2G) faz-se necessário a hidrólise prévia (sacarificação) dos polissacarídeos celulose e hemiceluloses presentes na parede celular dos vegetais. Os processos de produção do etanol de primeira e de segunda geração estão resumidos nas Figuras 06 e 07.

Figura 06: Produção de etanol 1G.



Fonte: Cortez et al. (2008).

Figura 07: Produção de etanol 2G.



Fonte: Hamelink (2005).

Entende-se por etanol de segunda geração o produto obtido da hidrólise dos polissacarídeos presentes nos resíduos lignocelulósicos, transformando estes em monossacarídeos e a fermentação destes em etanol. A fermentação é um processo conhecido e de domínio, porém a hidrólise possui uma série de gargalos que necessitam ser avaliados para a melhor reprodução em escala industrial (LORA, 2012).

A hidrólise pode ser realizada por processos que utilizam ácidos, bases, solventes orgânicos ou enzimas. Dentre estes, a rota enzimática tem sido amplamente estudada nos últimos anos, visando obter o máximo da sua potencialidade em proporcionar maiores rendimentos e não formar subprodutos indesejáveis. Porém, fatores como o alto custo das enzimas, a baixa produtividade e dificuldade em se atingir os rendimentos esperados têm se mostrado importantes desafios científicos para o sucesso comercial da técnica (CTBE, 2015).

Segundo Alfred Szwarc, consultor de emissões e tecnologia da União da Indústria de Cana-de-açúcar, nos últimos anos vem se observando no mundo, um grande interesse pela utilização de resíduos lignocelulósicos na obtenção de etanol. O governo dos EUA e também algumas empresas privadas têm investido milhões de dólares em pesquisas científicas na produção de etanol 2G. Estima-se uma produção de 15 bilhões de litros em 2022. No Brasil, apesar dos investimentos serem mais modestos, existem algumas iniciativas em curso fomentadas principalmente pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT). O Brasil apresenta uma grande vantagem competitiva em relação a outros países que buscam essa tecnologia: o baixo custo e a disponibilidade de grandes quantidades de matéria-prima principalmente com o uso do bagaço e da palha da cana-de-açúcar. A expectativa é que os processos de hidrólise produzam cerca de 300 litros de etanol por tonelada de bagaço seco, dependendo da quantidade de matéria-prima direcionada para o processo e da eficiência do mesmo (UNICA, 2012).

A disposição mundial para o desenvolvimento do processo de produção de etanol de 2G aponta para uma alternativa futura da estabilização do consumo das matérias-primas atualmente empregadas (cana-de-açúcar no Brasil, milho nos EUA e beterraba na Comunidade Europeia). Com isto, ameniza-se o clima nos debates sobre a possível competição entre combustíveis e alimentos. Segundo Ramos (2008), no Brasil existe uma vasta biodiversidade e assim, uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais que podem ser bioprocessados para trazer benefícios socioeconômicos. Exemplos desses resíduos são os derivados de atividades das indústrias de papel e celulose (cavacos de eucalipto e pinus), serrarias (serragem), usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana) e, de um modo geral, unidades de produção agrícola (palhas de cereais, sabugo de milho, cascas de arroz, etc.).

A produção comercial de etanol pela fermentação de materiais lignocelulósicos é uma alternativa conhecida desde o final do século XIX, mas a busca de menores custos de produção, necessários para a competição no mercado de combustíveis, é uma proposta relativamente

nova e com uma abordagem maior durante os últimos vinte anos (MACEDO, 2007). Até 2012, segundo Palácio et al. (2012), a obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos não era, ainda, viável economicamente em escala industrial. O autor indicou, naquele momento, que a solução desse problema nos próximos anos, estaria na determinação de uma melhor opção para disponibilizar a glicose a partir da hidrólise da celulose em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado.

Em seminário apresentado no Rio de Janeiro pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Social (BNDS), em abril de 2015, mostrou-se que há no mundo, atualmente, oito grandes projetos em desenvolvimento para produção de etanol 2G em escala industrial, totalizando uma produção mundial prevista de 635 milhões de litros por ano. Nos Estados Unidos destacam-se os Projetos POET-DSM e Abengoa com uma produção individual de 95 milhões de litros e o Projeto Dupont com previsão para 115 milhões de litros, todos a partir de biomassa residual da cultura do milho. Na China, também a partir de resíduos do milho, está em desenvolvimento o Projeto Shandong com uma produção anual de 65 milhões de litros. O Projeto M&G, em execução na Itália, prevê uma produção de 80 milhões de litros de etanol a partir da cana-do-reino (*Arundo donax*).

No Brasil, quatro instalações industriais usam os resíduos lignocelulósicos da cana-de-açúcar para uma produção nacional de 363 milhões de litros. Todas essas unidades fazem uso da palha e do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa: o Projeto Granbio, instalado em São Miguel dos Campos, Alagoas, com capacidade para a produção de 88 milhões de litros, o Projeto Abengoa (mesmo nome do projeto nos EUA), com duas plantas, uma em Pirassununga (São Paulo) com produção anual de 90 milhões de litros e outra em São João do Boa Vista (São Paulo) com produção de 145 milhões de litros por ano. A quarta unidade, denominada de Projeto Raízen, está localizada em Piracicaba, São Paulo, e produz anualmente 40 milhões de litros de etanol 2G. Prevê-se para o ano de 2020 que os custos de produção, por litro, de etanol de 2G será de R\$ 0,50 enquanto que o etanol 1G será R\$ 0,70. Espera-se para este ano (2020) que a produção de etanol 2G seja economicamente viável com um rendimento de 17 mil litros por hectare de cana-de-açúcar (2G) contra 69 mil litros por hectare (1G). A maior dificuldade está relacionada às etapas mecânicas de produção e movimentação de biomassa.

2.5 Resíduos Lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos representam a maior fonte de carbono e, portanto, energia renovável da terra. Entretanto, grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são acumulados, anualmente, decorrentes da produção agrícola e beneficiamento de cereais, dentre inúmeras outras transformações operadas com esses recursos naturais (MICHEL, 2007).

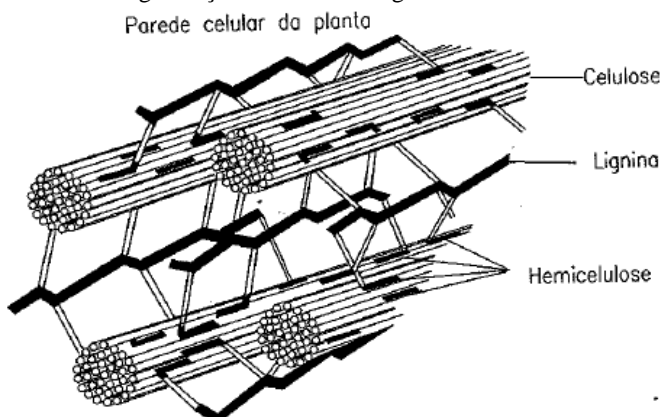
Todas essas matérias-primas se caracterizam pelo seu alto conteúdo em celulose, um polissacarídeo formado por longas cadeias de glicose, muito resistentes, que precisam ser quebradas para disponibilizar os açúcares suscetíveis à fermentação (glicose) e à transformação em etanol. As tecnologias de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (denominadas de segunda geração) podem triplicar sua produção por hectare e, ao contrário das matérias-primas das tecnologias de primeira geração, não competem com a produção de alimentos. Além disso, embora a maior parte dos estudos científicos concordem que os biocarburantes produzem menores emissões de GEE (entre 30-35%), o bioetanol produzido usando tecnologias de segunda geração poderia diminuí-la em torno de 70% (LORA, 2012).

A biomassa lignocelulósica está composta basicamente de carboidratos (celulose e hemicelulose), lignina (Figura 08) e uma pequena parte constituída por extrativos, ácidos, sais e minerais. A celulose e hemicelulose são polissacarídeos que podem ser hidrolisados em açúcares e eventualmente ser fermentados para obter bioetanol (DEMIRBAS, 2005 e ARIN e DEMIRBAS, 2004).

1. *Celulose* (40-60% de biomassa seca): é um polímero linear formado por glicoses (também chamada de açúcar C_6) unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$ – as orientações das ligações do hidrogênio adicional fazem com que o polímero seja rígido e difícil de quebrar. Na hidrólise, são quebrados em moléculas de glicose livres mediante a adição de água, processo chamado de sacarificação.
2. *Hemiceluloses* (20-40% de biomassa seca): pequenas cadeias altamente ramificadas de vários monossacarídeos, principalmente xilose (C_5), arabinose (C_5), galactose (C_6) e glicose. A hemicelulose é relativamente fácil de hidrolisar devido a sua natureza amorfa e ramificada.
3. *Lignina* (10-15% de biomassa seca): está presente em toda biomassa lignocelulósica, mas sua conversão em carboidratos não é possível, sendo assim, qualquer processo de produção de

bioetanol terá lignina como co-resíduo. Este é um polímero complexo de fenilpropano e grupos metoxílicos, uma substância polifenólica que cobre as paredes celulares. A lignina é degradável somente por alguns micro-organismos, com vistas à produção de produtos de alto valor, tais como ácido orgânicos, fenóis e vanilina. Mediante processos químicos pode-se produzir aditivos valiosos para combustíveis (HAMELINK et al., 2005).

Figura 08: Forma de organização da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Cardenas (2006).

Dependendo das suas características físicas e propriedades físico-químicas, a biomassa pode ser empregada como substrato de fermentação mediante uma sequência de operações unitárias específicas à sua natureza. De acordo com Balat et al. (2007) pode-se necessitar de pré-tratamentos físicos para a redução do teor de umidade (secagem) ou tamanho da partícula (trituração e/ou moagem); e pré-tratamento químico (ácido ou alcalino) para deslignificação, sacarificação; seguido por filtração; concentração de açúcares (evaporação); destoxificação (redução ou remoção dos inibidores da fermentação); fermentação; extração e purificação do etanol.

Diversos trabalhos científicos com diferentes objetivos, caracterizaram inúmeros tipos de resíduos lignocelulósicos conforme apresentados na Tabela 01.

Tabela 01: Composição percentual de celulose, hemicelulose e lignina de diversos tipos de biomassa.

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Fonte
Bagaço de cana	40	29	23	Oliveira, et al. (2013)
Palha de cana	44	31	19	Santos et al. (2014)
Sabugo de milho	40	27	17	Du et al. (2015)
Palha de trigo	32	17	21	Wang et al. (2014)
Palha de arroz	39	23	31	Suriyachai et al. (2013)
Casca de arroz	34	24	19	Soltani et al. (2015)
Capim-elefante	60	24	08	Minmunin et al. (2015)
Palha de cevada	39	41	19	Oun e Rhin (2016)
Pseudocaule de bananeira	52	10	11	Romero-Anaya et al. (2011)
Pseudocaule de bananeira	38	29	08	Souza et al. (2017)

Fonte: Primária (2017).

De acordo com Nunes et al. (2013), o Brasil possui diversas fontes alternativas para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos, dentre os quais destacam-se a palha de cana-de-açúcar, bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo, palha de arroz e pseudocaule da bananeira. A palha e bagaço da cana, contém um teor celulósico, em média, de 39% e 43%, respectivamente, com estimativa de um potencial de produção de etanol em torno de 88 e 101 bilhões de litros. Já os resíduos da cultura do arroz e trigo apresentam um potencial de 1,15 e 2,37 bilhões de litros, e o pseudocaule da bananeira, que possui o maior teor de celulose, apresenta um potencial de, aproximadamente, 17 bilhões de litros de etanol. A base de cálculo foi massa seca. As diferenças nos teores de celulose e hemicelulose para os estudos com pseudocaule de bananeira são atribuídas à diferentes espécies e estação de colheita.

Estudos apontam a viabilidade técnica e o sucesso do uso de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol. Na Tabela 02 estão

identificados alguns trabalhos realizados no Brasil com diferentes resíduos previamente hidrolisados para a produção de etanol 2G.

Tabela 02: Trabalhos científicos com resíduos lignocelulósicos no Brasil.

Biomassa	Obtenção do açúcar	Fonte
Palha e casca de arroz	Moídas e peneiradas com hidrólise ácida e hidrólise enzimática	Furlan (2009)
Cascas de banana	Hidrólise ácida e hidrólise enzimática com diferentes concentrações de massa úmida inicial	Schulz et al. (2010)
Resíduos de algodão	Moídas, hidrólise alcalina, sacarificação, hidrólise enzimática	Guedes (2012)
Resíduos da cana-de-açúcar e celulose	Secas, moídas, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, hidrólise enzimática	Santos (2012)
Cascas de banana	<i>In natura</i> e secas/moídas, após a hidrólise ácida e hidrólise enzimática.	Hopfner (2015)
Cavaco de bambu	Hidrólise ácida, hidrólise alcalina e hidrólise enzimática	Jardim e Gouvêa (2015)
Resíduos da Indústria de Sucos	Secas, moídas, hidrólise alcalina e hidrólise ácida	Pereira et al. (2014)
Bagaço de malte	Explosão à vapor, hidrólise ácida e hidrólise enzimática	Lima et al. (2014)
Resíduos da produção de farinha de mandioca	Hidrólise enzimática	Costa et al. (2016)

Polpa residual do processamento de azeitona	Hidrólise ácida	Pereira et al. (2016)
Pseudocaule de bananeira	Hidrólise ácida e enzimática sem concentração e destoxificação do mosto	Gonçalves Filho et al. (2013)
Pseudocaule de bananeira	Hidrólise ácida e enzimática com concentração e destoxificação do mosto	Souza et al. (2017)

Fonte: Primária (2017).

Embora a biomassa lignocelulósica venha sendo considerada como a matéria-prima mais promissora, devido a sua grande disponibilidade e baixo custo de aquisição, a produção comercial de etanol 2G não é ainda competitiva com a do etanol 1G em função de seu alto custo global. Segundo Perdices et al. (2012), o custo de produção do etanol lignocelulósico depende grandemente da escala de produção e do tipo de hidrólise utilizada, os quais podem representar mais de 40% do custo total do processo.

Buckeridge et al. (2013) reforçam a importância dos custos associados principalmente à conversão da biomassa em açúcares fermentáveis e destacam que para se obter níveis aceitáveis de comercialização do etanol 2G (US\$ 0,36/kg) será necessária a redução dos mesmos. Segundo os autores, um dos reagentes mais utilizados nessa etapa do processo tem sido o ácido sulfúrico, o qual contribui significativamente pelo alto custo do produto final (cerca de US\$ 0,80/kg) quando comparado à produção de etanol de amido (US\$ 0,35/kg) e da cana-de-açúcar (US\$ 0,27/kg).

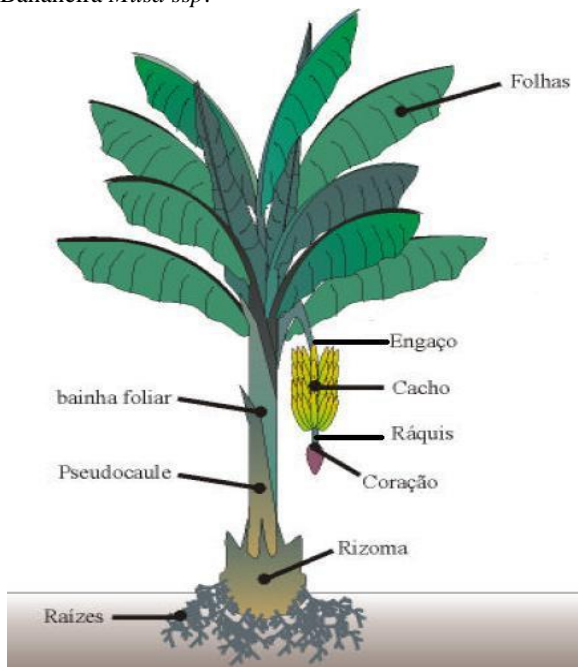
2.6 Resíduos da Bananicultura

Depois da Índia, Equador e Filipinas, o Brasil é o maior produtor mundial de bananas. A banana é a segunda fruta mais consumida no planeta, com 11,4 kg/habitante/ano, perdendo apenas para a laranja, com 12,2 kg/habitante/ano. A produção mundial de bananas em 2015 foi de aproximadamente 7,0 milhões de toneladas (FAO, 2015).

A bananeira (*Musa ssp.*) (Figura 09) pertence à família botânica *Musaceae* e é originária do Extremo Oriente. É uma planta tropical, ou seja, adapta-se bem em clima quente e úmido, não suportando temperaturas inferiores a 15 °C, em que a atividade da planta é paralisada, ou superior a 35 °C, em que seu desenvolvimento é inibido. As regiões litorâneas equatoriais são favoráveis para o bom desenvolvimento da bananeira, pois apresentam temperaturas médias anuais entre 26 e 27 °C, consideradas ótimas para o cultivo da bananeira (ABAVAR, 2015 e ITAL, 1985).

A banana mais produzida no mundo é a do subgrupo *cavendish*, que apresenta 47% da produção mundial de banana, sendo também a mais importante para a exportação. A América Latina é a região responsável pela maior produção e exportação de *Musa cavendish*. Esta espécie é conhecida no Brasil como banana nanica, mas recebe outros nomes como: banana d'água, verde, anã, entre outros, e é chamada de *dwarf cavendish* pelos países de língua inglesa (ITAL, 1985).

Figura 09: Bananeira *Musa ssp.*



Fonte: Soffner (2001).

No Brasil, a banana é cultivada na maioria dos estados brasileiros. As condições de clima (temperatura, umidade relativa, precipitação e insolação) permitem que a produção seja distribuída durante todo o ano, atendendo de forma regular as necessidades de consumo. Santa Catarina ocupa no cenário nacional a terceira posição como maior produtor de bananas (721,6 mil toneladas/ano). São cerca de 3678 produtores que se dedicam a essa atividade. O Litoral Norte do Estado concentra 86,7% da produção estadual, onde predominam os cultivares Nanica e Nanicão, componentes do tipo Caturra. Já no Litoral Sul, que representa cerca de 13,3% da produção estadual, os cultivares mais usados são a Enxerto e a Branca, componentes do tipo Prata. Os municípios com maior produção na safra de 2016 foram: Luiz Alves (24,0%), Corupá (22,9%), Massaranduba (8,9%), Jaraguá do Sul (7,0%) e São João do Itaperiú (6,5%). A soma da produção destes municípios do nordeste catarinense é responsável por 69,8% da produção estadual, ou seja, 503,6 mil toneladas (CEPA, 2016).

Após a retirada do cacho da bananeira, o pseudocaulo adulto é cortado e deve ser feito o desbaste, que consiste em eliminar o rebento (pseudocaulo broto) ruim e deixar os pseudocaulos brotos que irão substituir os que foram cortados. Normalmente esta biomassa lignocelulósica é abandonada na plantação contribuindo para a propagação do mal de sigatoca e outros problemas ambientais decorrentes da sua degradação.

Existem diversos usos para as fibras do pseudocaulo da bananeira, a maioria limitada a trabalhos artesanais (FERIOTTI, 2010). Espécies de bananeira como a *M. textiles*, conhecida como abacá ou bananeira-de-corda, são cultivadas especialmente para a produção de fibras têxteis a partir de seu pseudocaulo. Essas fibras são utilizadas na manufatura de tecidos para roupas em geral e produtos artesanais como bolsas, sacolas e chapéus (MEDINA, 1959; HIROCE, 1972; JARMAN et al. 1997, SOFFNER, 2001).

De acordo com Jarman et al. (1997), o pseudocaulo da bananeira é constituído de feixes fibrosos com comprimentos relacionados ao comprimento do pseudocaulo e representa de 1-1,5% da composição. Os outros constituintes são substâncias mucilaginosas (4 a 8%) e água (90 a 96%).

O aproveitamento do pseudocaulo da bananeira como biomassa na produção de etanol 2G tem sido estudado e parece ser uma boa alternativa para valorização do resíduo. Segundo Souza *et al.* (2010), para cada tonelada de banana colhida em torno de quatro toneladas de massa úmida de resíduos agroindustriais são gerados (fruta

integral rejeitada para consumo humano, cascas de banana, engaço, folhas e pseudocaule da bananeira); sendo 75% de pseudocaule. Considerando apenas a microrregião de Joinville é possível estimar uma produção anual de mais de 1,12 milhões de toneladas de pseudocaule disponível (280 mil toneladas de massa seca) para produção de biocombustível.

Esse tipo de produção torna-se um processo bastante atraente pois, além de permitir a criação de uma fonte alternativa e renovável de energia e de contribuir com a redução de resíduos no meio ambiente, a geração de energia pode agregar valor à matriz produtiva da fruta (SOUZA et al., 2012).

Em relação à composição química dos resíduos da bananeira (Tabela 03), Oliveira et al. (2007) analisaram a composição química do engaço e folhas da bananeira *M. Dwarf Cavendish*. Souza et al. (2012) avaliaram as cascas de banana enquanto que Ingale et al. (2014), Cordeiro et al. (2004) e Guimarães (2009) analisaram exclusivamente o pseudocaule.

Tabela 03: Composição percentual em base seca de celulose, hemicelulose e lignina dos resíduos da bananicultura.

Partes da bananeira	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Fonte
Engaço	28,40	9,50	10,50	Oliveira et al. (2007)
Casca de banana	8,40	5,36	2,05	Souza et al. (2012)
Folhas	20,70	11,40	8,79	Oliveira et al. (2007)
Pseudocaule <i>Musa cavendishii</i>	36,10	24,50	4,50	Ingale et al. (2014)
Pseudocaule <i>Musa acumiunata</i>	34,50	25,60	12,00	Cordeiro et al. (2004)
Pseudocaule <i>Musa sapientum</i>	50,15	0,77	17,74	Guimarães (2009)

Fonte: Primária (2017).

Na Tabela 03 pode-se observar que entre os resíduos oriundos da bananicultura, o pseudocaule de bananeira é aquele que apresenta um

maior teor de celulose e hemicelulose quando comparado ao engaço, folhas e cascas. O pseudocaule é o resíduo mais abundante na cultura da banana e com teores elevados de celulose e hemicelulose torna-se um bom substrato para a produção de etanol 2G.

2.7 Tecnologias de conversão de biomassa lignocelulósica em etanol 2G

O processo de produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos via hidrólise possui ao menos quatro etapas bem definidas: pré-tratamento, sacarificação, fermentação e recuperação. Dependendo da integração destas etapas, o processo pode ser realizado num menor número de etapas. A sacarificação e fermentação podem ser realizadas de forma simultânea, ou a recuperação pode ser realizada ao mesmo tempo que a fermentação. A escolha do tipo de pré-tratamento é fundamental, pois esse processo influencia todas as etapas de processamento subsequentes e há eficiência e economia do processo global no aproveitamento da biomassa lignocelulósica. Existem diversos pré-tratamentos com diferentes efeitos e rendimentos e a escolha do mais adequado depende da biomassa empregada (SADDLER e KUMAR, 2013).

2.7.1 Pré-tratamento físico

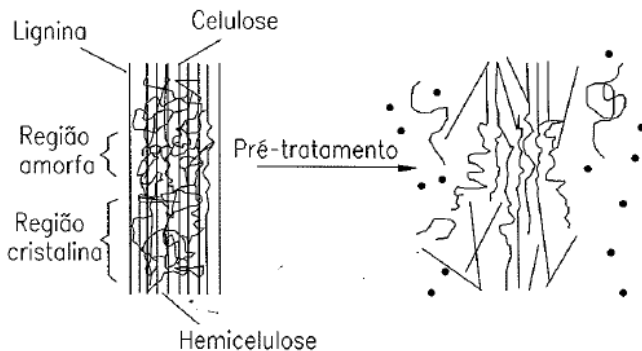
A maioria da biomassa lignocelulósica requer processos mecânicos para redução de tamanho. Alguns métodos de pré-tratamento incluem fresagem, irradiação (usando raios gama, irradiação de elétrons, radiação por microondas, etc) e extrusão, que são comumente usados para melhorar a hidrólise enzimática e biodegradabilidade dos materiais lignocelulósicos. Os melhores resultados da hidrólise são devido à redução da cristalinidade e melhoria na transferência de massa, característica da redução do tamanho de partícula. A energia requerida para o pré-tratamento físico é dependente do tamanho final da partícula e da redução da cristalinidade do material lignocelulósico (YANG e WYMAN, 2008). A pirólise também tem sido utilizada para o pré-tratamento de materias lignocelulósicos. Quando os materiais são tratados com temperatura acima de 300 °C, a celulose se decompõe rapidamente produzindo produtos gasosos e carbono fixo residual. A baixas temperaturas se formam menos produtos voláteis e a decomposição é mais lenta (SUN e CHENG, 2002).

2.7.2 Pré-tratamento físico-químico

A solubilização dos componentes lignocelulósicos depende da temperatura, pH e teor de umidade. Nos materiais lignocelulósicos a hemicelulose é a fração com menor estabilidade térmica e a mais quimicamente sensível (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). O propósito do tratamento físico-químico é remover a lignina e a hemicelulose, incrementar a porosidade dos materiais e reduzir a cristalinidade da celulose para fazê-la mais acessível ao ataque das enzimas, as quais convertem os polímeros carboidratos em açúcares fermentáveis. Relativamente aos pré-tratamentos físico-químicos, os mais utilizados são: explosão de fibras com amoníaco (AFEX, Ammonia Fiber Explosion), explosão a vapor e tratamento com água líquida a elevada temperatura (LHW, Liquid Hot Water). Um dos tratamentos mais empregados é a explosão a vapor que consiste no aquecimento da biomassa por um certo tempo, tipicamente alguns minutos, através do contato com uma corrente de vapor saturado a alta pressão (0,69 a 4,83 MPa) e a temperaturas de 160-260 °C (ZHENG et al., 2014), fazendo com que o vapor penetre no material. Este sistema pressurizado sofre posteriormente uma descompressão súbita, causando a ruptura da estrutura rígida das fibras da biomassa (STELTE, 2013). Os principais parâmetros do processo de explosão a vapor são o tamanho da biomassa, a temperatura e o tempo de residência. O tratamento por explosão a vapor apresenta as seguintes vantagens: não é necessária a utilização de reagentes, com exceção da água; permite a obtenção de um elevado rendimento em hemicelulose, com baixa formação de produtos de degradação; comparativamente com processos de hidrólise ácida, a explosão a vapor não necessita de equipamento tão resistente à corrosão devido ao pH do meio apresentar valores intermédios. Uma das desvantagens deste processo é a ocorrência de uma possível degradação dos açúcares provenientes da hemicelulose durante este pré-tratamento, resultando numa perda de carbono (HENDRICKS, 2009).

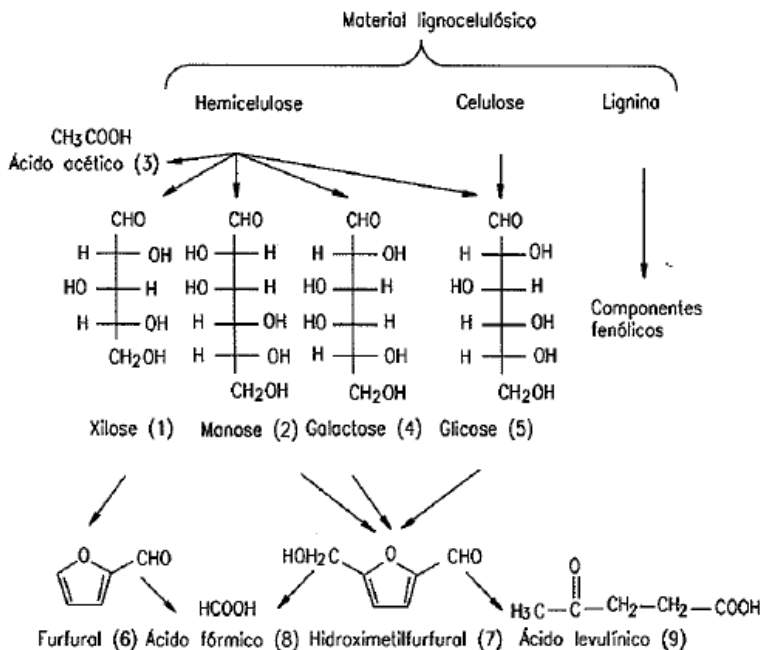
Nas Figuras 10 e 11 é mostrado o efeito do pré-tratamento do material lignocelulósico e as reações que ocorrem durante estes tratamentos, respectivamente (MOSIER, et al., 2005, PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Figura 10: Efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico.



Fonte: Mosier (2005).

Figura 11: Produtos e subprodutos do pré-tratamento do material lignocelulósico.



Fonte: Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000).

A etapa de pré-tratamento normalmente leva à formação de produtos como monômeros de pentoses e hexoses, ácidos orgânicos (principalmente ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico) e aldeídos furano (5-HidroxiMetilFurfural (HMF) e furfural). Após a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa, a lignina permanece como resíduo sólido, apesar de uma pequena parte ser degradada liberando compostos fenólicos entre outros compostos aromáticos (JONSSON et al., 2013). Estes compostos podem inibir o processo de fermentação interferindo nas funções celulares entre as quais a integridade da membrana plasmática, inibindo o crescimento das células, podendo até mesmo provocar a morte celular (REGINATTO e ANTONIO, 2015).

Os processos físico-químicos de pré-tratamento utilizando ácido diluído, vapor de alta pressão ou água quente possibilitam a remoção seletiva da hemicelulose, produzindo soluções sacarídicas (pré-hidrolisados) com elevado teor de pentoses e reduzido teor de lignina. Processos alcalinos tendem a promover maior dissolução da lignina e menor solubilização/fragmentação da hemicelulose. Basicamente, extrações seletivas dos componentes não celulósicos (lignina e hemicelulose) utilizando álcalis ou ácidos têm sido realizadas a custos relativamente razoáveis. Em particular, pré-tratamentos utilizando vapor de água, ácido sulfúrico diluído, amônia e hidróxido de cálcio têm resultado as opções mais promissoras (ABRIL et al., 2006).

2.7.3 Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico emprega diferentes substâncias como ácidos, bases, agentes oxidantes ou solventes orgânicos (Organosolv). Entre estes métodos, o pré-tratamento utilizando ácido diluído é o mais amplamente utilizado. Dependendo da substância química utilizada, o pré-tratamento pode ter diferentes efeitos sobre os componentes estruturais da lignocelulose. Os pré-tratamentos alcalino, ozonólise, peróxidos ou oxidação por via úmida são mais efetivos na remoção da lignina enquanto que os ácidos diluídos são mais eficientes em solubilizar a hemicelulose (GALBE e ZACCHI, 2002; SÀNCHEZ e CARDONA, 2008; TOMAS-PEJO et al, 2008).

A hidrólise ácida é utilizada no pré-tratamento da biomassa tanto diretamente para a quebra da hemicelulose e celulose em seus respectivos e principais monômeros xilose e glicose, quanto para proporcionar um tratamento inicial para posterior hidrólise enzimática desses polímeros. Ácidos concentrados são poderosos agentes hidrolisantes para a celulose, porém são corrosivos, tóxicos e

prejudiciais ao meio ambiente. Já os ácidos diluídos têm garantido o sucesso da hidrólise da biomassa lignocelulósica, principalmente o ácido sulfúrico. Altas temperaturas associadas aos ácidos diluídos são favoráveis para a hidrólise da celulose (YE e CHENG, 2002). A combinação de diferentes concentrações de ácido sulfúrico diluído, temperatura e tempo de reação no pré-tratamento de várias biomassas lignocelulósicas avaliadas por diferentes autores é apresentada na Tabela 04.

Tabela 04: Combinação de diferentes concentrações de ácido sulfúrico diluído, temperatura e tempo de reação no pré-tratamento de várias biomassas lignocelulósicas avaliadas por diferentes autores.

Biomassa	Concentração do ácido (m/m)	T (°C)	Tempo (min)	Fonte
Palha de trigo	0,5%	180	15	Saha et al. (2005)
Palha de milho	2%	120	43	Lu et al. (2007)
Cascas de banana	1%	120	30	Schulz (2010)
	2%	120	15	Schulz (2010)
Palha de arroz	1%	180	1-5	Hsu et al. (2010)
Gramma	1,2%	140	30	Redding et al. (2011)
Palha de arroz	1%	120	15	Belal (2013)
Cascas de banana	2,5%	121	15	Ferreira (2013)b
Pseudocaule de bananeira	1%	120	30	Gonçalves Filho et al. (2013)
	2%	120	15	Souza et al. (2014a)

Fonte: Hopfner (2015).

Algumas bases podem ser usadas como pré-tratamento de materiais lignocelulósicos e seu efeito é dependente da quantidade de lignina do material. Tratamento com hidróxido de sódio diluído causa inchaço levando a um aumento da área superficial interna, decréscimo no grau de polimerização, decréscimo na cristalinidade, separação das ligações estruturais entre lignina e carboidratos e ruptura da estrutura de lignina (GÍRIO et al, 2010). O pré-tratamento alcalino pode melhorar significativamente a digestibilidade da celulose e degradação dos açúcares, porém a sua aplicação é prejudicada pelos altos custos das bases. A utilização de hidróxido de cálcio como um agente alcalino barato e sua recuperação e regeneração ou amônia que é reciclável devido sua volatilidade podem ser uma solução para este problema (KIM e HOLTZAPPLE, 2006; WYMAN et al, 2005).

O processo de ozonólise é usado para solubilizar lignina e uma pequena fração de hemicelulose. É realizado à temperatura ambiente e pode remover eficientemente a lignina sem produzir resíduos tóxicos. A maior desvantagem deste processo é a grande quantidade de ozônio utilizada o que encarece os custos do processo (SUN e CHENG, 2002). Binder et al. (1980) investigaram a deslignificação da palha de trigo pelo tratamento com ozonólise e biodegradabilidade do resíduo sólido restante. Foi demonstrado uma redução de 50% do conteúdo de lignina original otimizando a hidrólise enzimática. Depois do tratamento, 75% da celulose foi digerida comparada com 20% da palha não tratada.

Os processos Organosolv recorrem a solventes orgânicos, como etanol, metanol, acetona e etilenoglicol, para remoção da lignina e hidrólise da hemicelulose (HARMSEN et al., 2010). Os processos se baseiam no cozimento da biomassa lignocelulósica com o solvente Organosolv, à elevada temperatura e pressão, e posterior recuperação da celulose e da lignina. O solvente orgânico é removido e recuperado por evaporação e destilação, sendo reciclado no processo. Os processos Organosolv se mostram muito eficientes no pré-tratamento que antecede à hidrólise. Entende-se que os mesmos têm grande potencial, quando seguidos pela etapa de hidrólise (ácida ou enzimática), ou quando a hidrólise ácida é realizada simultaneamente (SOARES e ROSSELL, 2007).

2.7.4 Pré-tratamento enzimático

O processo de hidrólise enzimática oferece muitas vantagens em comparação com os processos de hidrólise química citados anteriormente. Este atinge elevados rendimentos de produção sob condições moderadas. Porém, necessita de avanços consideráveis para aplicação como tecnologia economicamente viável, principalmente devido ao alto custo das enzimas (MENON, 2012).

Geralmente, o processo de hidrólise enzimática apresenta vantagens associadas à obtenção de rendimentos superiores a 0,85 g de glicose/g de celulose, sob temperaturas de 40-50 °C e pressão atmosférica. Entretanto, aspectos operacionais relacionados à elevada duração do processo (48-72 h), desativação catalítica por inibição da atividade enzimática, além do custo das enzimas, têm acarretado incertezas quanto à viabilidade econômica do processo de hidrólise enzimática no contexto da produção de bioetanol, a partir de biomassas lignocelulósicas (MACEDO, 2008).

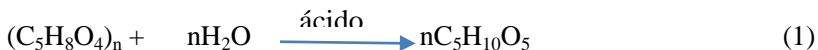
Na Figura 12 apresenta-se o diagrama de fluxo do processo de bioconversão da biomassa em etanol utilizando-se dentre várias etapas, a hidrólise enzimática.

Figura 12: Diagrama de fluxo de processo de conversão de biomassa em etanol utilizando-se dentre várias etapas, a hidrólise enzimática.



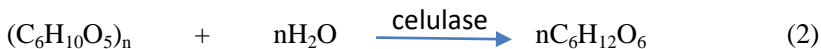
Fonte: Hahn-Hägerdal et al. (2007).

A reação primária, hidrólise da hemicelulose para obter a xilose, pode ser representada mediante a equação (1).

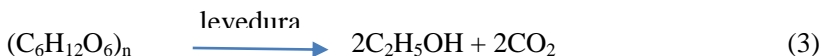


A xilose produzida neste processo pode ser fermentada em bioetanol por alguns micro-organismos específicos.

Na etapa de hidrólise da celulose, as enzimas celulase catalisam a conversão da mesma para glicose mediante a reação indicada na Equação (2).



Vários micro-organismos, como as leveduras, podem fermentar a glicose em bioetanol, conforme mostrado na Equação (3).



Os principais problemas referentes à eficiência de conversão dos hidrolisados lignocelulósicos em bioetanol estão relacionados com os seguintes aspectos: (1) Após o pré-tratamento, os hidrolisados contêm açúcares fermentáveis e outros componentes que podem causar a inibição dos micro-organismos usados na fermentação. (2) Os hidrolisados da hemicelulose contêm hexoses e pentoses. Os primeiros Açúcares Redutores (AR) podem ser fermentadas por *Saccharomyces cerevisiae* empregando processos amplamente conhecidos, enquanto as pentoses são mais difíceis de fermentar (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 2006).

2.7.5 Formação de Compostos Inibidores

Um dos grandes problemas da etapa de pré-tratamento é a formação de inibidores que interferem na etapa de fermentação. Estes inibidores geralmente são ácidos, compostos fenólicos ou produtos de degradação dos carboidratos presentes na matéria-prima ou lignina (MIKULÁŠOVÁ *et al.*, 1990). Uma das formas de reduzir o impacto desses compostos na etapa de fermentação é minimizá-los, ou aplicar um método posterior de destoxificação do caldo hidrolisado previamente à fermentação.

Olsson e Hahn-Hagerdal (2006) citam que existem hidrolisados contendo mais de 60 componentes, porém os que apresentam maiores impactos inibidores no metabolismo microbiano são

ácido acético e produtos resultantes da degradação da lignina. Taherzadeh e Karimi (2008) comentam que a inibição da etapa de fermentação ocorre devido à combinação de diversas substâncias presentes no hidrolisado, mesmo em baixas concentrações. Assim, a fermentabilidade de um meio sintético preparado com os principais componentes inibidores muitas vezes difere bastante da cinética obtida para um caldo hidrolisado real. Na Tabela 05 mostra-se os principais inibidores, suas origens, faixa de concentração testada e porcentagem de inibição no crescimento microbiano ou fermentação. Os furaldeídos constituem um grupo importante de inibidores presentes no hidrolisado. São representados principalmente pelo 2-furaldeído (furfural) e 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF), formados a partir da desidratação ácida de açúcares, representados pelas pentoses (xilose) e hexoses (glicose), respectivamente (ALMEIDA et al., 2009).

Tabela 05: Inibidores do metabolismo microbiano de *Saccharomyces cerevisiae* e *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* resultantes do processo de pré-tratamento da biomassa.

Origem do grupo	Inibidor	Concentração (g/L)	Microorganismo	% de inibição
Compostos liberados no pré-tratamento e hidrólise	Ácido acético	1,4	<i>S. cerevisiae</i>	50%, pH 4,5
	Ácido acético	4,3	<i>S. cerevisiae</i>	50%, pH 5,5
	Ácido acético	8,0	<i>S. stipitis</i>	98%, pH 5,1
	Ácido acético	8,0	<i>S. stipitis</i>	25%, pH 6,5 fermentação
Produtos de degradação de açúcares	Furfural	1,0	<i>S. stipitis</i>	71%
	5-hidroxiacetilfurfural	3,0	<i>S. stipitis</i>	90%
	Ácido fórmico	2,7	<i>S. cerevisiae</i>	80% crescimento
Outros compostos presentes no meio	Acetaldeído	5,0	<i>S. cerevisiae</i>	80%
	Etanol	120	<i>S. cerevisiae</i>	100%
	Ácido láctico	38	<i>S. cerevisiae</i>	80% crescimento
Produtos de degradação da lignina	Cinamaldeído	1,0	<i>S. cerevisiae</i>	100%
	p-hidroxibenzaldeído	1,0	<i>S. cerevisiae</i>	48%
	Seringaldeído	0,22	<i>S. stipitis</i>	72% fermentação

Fonte: Almeida et al. (2009).

Pode-se observar na Tabela 05 que, geralmente, os produtos de degradação da lignina apresentam maior impacto no crescimento ou fermentação por *S. cerevisiae* ou *P. stipitis*, mesmo a baixas concentrações (0,22 ou 1,0 g/L). A maioria dos métodos de pré-tratamento na literatura realizam a lavagem da matéria-prima após o processo de deslignificação (RABELO, 2010), o que provavelmente remove esses componentes, evitando problemas mais graves na fermentabilidade.

Vários métodos de destoxificação, baseados na remoção de inibidores dos hidrolisados lignocelulósicos têm sido testados para incrementar sua fermentabilidade. Métodos químicos, físicos e biológicos são empregados. Entre estes pode-se citar: a adsorção em carvão vegetal ativado, extração com solventes orgânicos, troca de íons, cromatografia de exclusão de íons, peneiramento molecular e a alteração do pH por meio da adição de ácidos ou bases. O primeiro e último método citados são os mais empregados (VENANCIO, 2007). O primeiro é mais econômico e eficiente e baseia-se na capacidade deste material em adsorver sobre sua superfície diferentes tipos de moléculas, as quais são retidas por forças de Van Der Waals. Essas forças são resultantes de uma atração intermolecular, de tal modo que seu potencial é, basicamente, uma função da área superficial do material. Dentre os vários materiais comumente usados em processos de adsorção física, o carvão vegetal ativo apresenta a maior área superficial. O tratamento baseado na alteração do pH com álcalis e ácidos consiste na elevação do pH inicial do hidrolisado por meio da adição de um álcali ou um ácido. Este método pode ser implementado por diferentes vias, mas a principal envolve a precipitação com hidróxido de cálcio e elevação da temperatura com posterior remoção do precipitado e adequação do pH para a fermentação (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007).

2.8 Processo Fermentativo

Os pré-tratamentos e processos de hidrólise são projetados para otimizar o processo fermentativo (GAMAGE et al., 2010). Esta via biológica natural depende das condições e das matérias-primas usadas e exigem a presença de micro-organismos para fermentar açúcar em álcool, ácido lático e outros produtos (WHEALS et al., 1999; CHANDEL et al., 2007).

2.8.1 Micro-organismos

Um importante fator de cautela industrial para a utilização de lignocelulose para a produção de bioetanol é a carência de micro-organismos capazes de fermentar eficientemente (com elevados rendimentos e taxas de conversão) todos os açúcares (pentoses e hexoses) liberados durante o pré-tratamento e a hidrólise. Em relação à produção comercial de etanol, o micro-organismo ideal deve ter ampla utilização de substratos, alta produtividade, altas taxas de conversão em etanol, tolerância a inibidores presentes no hidrolisado, atividade celulolítica e habilidade de fermentar açúcares em altas temperaturas (HANH-HAGERDAL et al., 2007).

Os micro-organismos mais indicados para a produção de etanol a partir de hexoses tem sido levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis* (CLAASSEN et al., 1999) que oferecem altas taxas de conversão em etanol (70-80% teoricamente) e alta tolerância ao etanol (acima de 10% m/v) no meio de fermentação. A maior desvantagem de cepas nativas de *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* é a sua inabilidade de utilizar a xilose, o principal açúcar derivado da hidrólise da hemicelulose (ROGERS et al., 2007; TALEBNIA e TAHERZADEH, 2006). Conforme Lima et al. (2001), *S. cerevisiae* é um micro-organismo aeróbico facultativo, capaz de converter glicose, frutose, galactose, manose e sacarose a etanol e CO₂ em condições de anaerobiose. As condições ideais de fermentação para esta levedura são pH 4,0 a 5,0 (TOSETTO, 2008) e temperatura de 30 °C a 35 °C (PARK, 2010) e substratos ricos em hexoses, principalmente glicose.

Z. mobilis é uma bactéria Gram-negativa e tem despertado grande interesse por conta do seu metabolismo peculiar e suas características no processo fermentativo para a produção de etanol. É um micro-organismo anaeróbico facultativo (FRIGIERI, 2007). Em comparação com as leveduras, esta bactéria apresenta via metabólica e condições de crescimento mais simples, e os substratos que podem ser utilizados por ela restringem-se a glicose, frutose e sacarose (MALVESSI, 2008 *apud* FRIGIERI, 2007). A temperatura de incubação de *Z. mobilis* empregada na produção de etanol tem sido 30 °C (PATLE & LAL, 2008; YANASE et al., 2012) e o pH 6,0 (MAITI et al., 2011; PINILLA et al., 2011).

Alguns micro-organismos são conhecidos por fermentar de forma satisfatórios tanto as hexoses quanto as pentoses. Dentre esses micro-organismos destacam-se: *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*,

Candida shehatae e *Pachysolen tannophilus* (CHANDEL et al., 2007; LIN e TANAKA, 2006).

Segundo Van Vleet e Jeffries (2009), a levedura *S. stipitis* apresenta um conjunto de características fisiológicas que a torna muito interessante para a bionconversão de açúcares em etanol. Além de apresentar capacidade de fermentar xilose, esta levedura é capaz de fermentar outros açúcares como glicose, manose, galactose e celobiose, com fatores de conversão de 0,3 – 0,44 g/g de substrato, fazendo com que tenha potencial aplicação em processos de fermentação para a produção de etanol (STAMBUCK et al., 2008). Apesar da *S. stipitis* ser considerada a de maior capacidade fermentativa de xilose, em relação a outros micro-organismos, esta espécie tem um baixo consumo de açúcar comparado ao da *S. cerevisiae* e requer condições microaerófilas para produção de etanol (AGBOGBO & COWARD KELLY, 2008). As condições ideais de fermentação alcoólica para esse micro-organismo, onde se obtém a máxima concentração de etanol, são: pH entre 4,5 e 6,0 e temperatura entre 30 a 32 °C (SLININGER et al., 1990 apud OLIVEIRA, 2013).

P. tannophilus foi a primeira levedura identificada com capacidade significativa para converter xilose em etanol, e nesta identificação constatou-se que esse micro-organismo pode fermentar todos os açúcares comuns, exceto L-arabinose (SLININGER et al., 1987). *P. tannophilus* consegue degradar pentoses e hexoses, sendo considerada uma das mais eficientes fermentadoras de xilose (pentose) (CHANDEL et al., 2007 apud FUGITA, 2010; SLININGER et al., 1985 apud OLIVEIRA, 2013). Em fermentações utilizando *P. tannophilus*, a oxigenação pode influenciar significativamente a produção e consumo de etanol pois podem ocorrer perdas significativas de etanol em condições aeróbias, resultado do metabolismo quando o açúcar presente é a xilose (KIIPER, 2009). Para *P. tannophilus*, o pH 6,0 é indicado como o ideal para altas produtividades em relação à fermentação alcoólica, enquanto que a temperatura ideal é de 30 °C (CONVERTI et al., 2001).

A fim de superar estas desvantagens, cepas geneticamente modificadas de *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* capazes de fermentar ambos os açúcares (pentoses e hexoses) foram desenvolvidas (KARHUMAA et al., 2007). Outras bactérias mesofílicas capazes de metabolizar pentoses na ausência de oxigênio são *Escherichia coli* e *Klebsiella sp.* Estas, depois de submetidas à modificações genéticas, estão sendo estudadas como alternativas para a fermentação alcoólica do licor da hidrólise de biomassa (LORA, 2012).

Outra estratégia muito explorada atualmente é a utilização de coculturas, também chamadas de culturas mistas ou consórcios. Coculturas de duas ou mais leveduras ou de leveduras e bactérias tem sido estudadas para verificar a potencial utilização sinérgica das vias metabólicas de diferentes micro-organismos (CUNHA-PEREIRA et al., 2011). A produção de biocombustíveis por sistemas de coculturas usualmente é maior do que a produção em monoculturas (LIN et al, 2011; AELING et al, 2012). Em geral, para a formação da cocultura são empregadas basicamente duas estratégias: utilização de dois micro-organismos, um é responsável pela sacarificação do resíduo e o outro pela síntese do produto em si; processo conhecido como SFS - Sacarificação e Fermentação Simultânea ou do inglês, SSF - Simultaneous Saccharification and Fermentation. Neste último, o micro-organismo além de ser capaz de produzir bioetanol ou outro produto ou subproduto, também é capaz de sintetizar celulases ou enzimas são adicionadas durante o cultivo (KUHAD et al, 2011).

Em estudo realizado por Patle e Lal (2008) com cocultura formada por *Z. mobilis* e *Candida tropicalis* no hidrolisado do resíduo de thippi (resíduo da mandioca com alto teor de amido), onde foi observado que, além de produzir maior quantidade de bioetanol em relação à monocultura, o tempo de fermentação foi menor. Das et al. (2013) utilizaram hidrolisado enzimático de palha de arroz como substrato da fermentação por *Z. mobilis* e *S. cerevisiae*. A maior produção de bioetanol foi de 41,1 mg/mL em pH 6 e temperatura de 30 °C. Os autores concluíram que o emprego deste consórcio foi uma alternativa apropriada para suprir a demanda de biocombustíveis e redução de resíduos descartados no meio ambiente. Hickert et al. (2013) utilizaram cocultura de *S. cerevisiae* e *Candida shehatae* no hidrolisado ácido da casca de arroz. Observaram que com a associação houve maior bioconversão em bioetanol. Para o trabalho de Singh, Majumder e Ghosh (2014) o controle de oxigênio para o mix com *Z. mobilis* e *S. stipitis* favoreceu a produção máxima de bioetanol no hidrolisado ácido de biomassa de grama.

2.8.2 Fatores que afetam a fermentação

Lima et al. (2001) descreve na Tabela 06 os diversos fatores químicos, físicos e microbiológicos que devem afetar um processo fermentativo alcoólico.

Tabela 06: Fatores químicos, físicos e microbiológicos que afetam a fermentação alcoólica.

Fatores	Características
Agentes de fermentação	Cada linhagem de micro-organismo tem suas características próprias, afetadas, pelas condições em que o processo fermentativo se desenvolve.
Nutrientes minerais e orgânicos	Os micro-organismos exigem uma fonte de carbono elaborada – glicose ou outro açúcar que fornece a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio. Algumas vitaminas, como tiamina e ácido pantotênico, também são necessárias. O meio deve fornecer, ainda, nitrogênio, fosforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco entre outros elementos em quantidades diminutivas.
Temperatura	As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa de 26 a 35 °C.
pH	As fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo a mais utilizada de 4 a 5 para o caso do uso de <i>S. cerevisiae</i> .
Inibidores de fermentação	O processo fermentativo pode ser inibido não somente pelo produto, como o etanol e ácidos orgânicos, mas também, por diferentes substâncias que podem estar presentes nos mostos. Minerais como potássio e cálcio, em quantidades excessivas podem acarretar efeitos negativos às leveduras.
Concentração de açúcares	Elevados teores de açúcar acarretam estresse osmótico da levedura. Dependendo do processo de fermentação uma ampla faixa de

concentração pode ser considerada ideal.

Concentração de inóculo	O elevado teor de micro-organismos exige maior energia para manutenção, ou seja, maior consumo de açúcar, que tem por consequência a maior competitividade pelos nutrientes do meio.
Contaminação bacteriana	Altas temperaturas de fermentação favorecem a contaminação bacteriana, a qual compromete a fermentação alcoólica.
Antissépticos	O uso de antissépticos são favoráveis ao desenvolvimento das leveduras e desfavorável a outros micro-organismo. Muitos agem inibindo bactérias e fungos.
Antibióticos	Os antibióticos possuem o mesmo efeito dos antissépticos, fazendo com que as fermentações sejam mais puras e regulares.

Fonte: Lima et al. (2001).

2.8.3 Formas de condução da fermentação

Diferentes tipos de processos para a fermentação de etanol têm sido propostos dentre os quais as mais comuns são: fermentação em batelada, contínua, contínua com reciclo de células e batelada alimentada (YOSHIDA et al., 2003). O processo de fermentação em batelada (descontínuo) é extensivamente usado para converter açúcar em etanol para a produção de bebidas e biocombustíveis. A fermentação em batelada é um sistema de cultura fechado. A biomassa e o substrato são adicionados ao fermentador sem remoção dos meios durante a fermentação e os produtos são colhidos no final da fermentação. O modo descontínuo tem desvantagens, particularmente quando os microorganismos são de crescimento lento ou fortemente afetados pela inibição do substrato. Elevadas concentrações de substrato levam a uma série de dificuldades, que evitam uma adequada performance do processo assim como produção de etanol limitada (BALLESTEROUS et al., 2002).

Um dos meios mais comuns de produção industrial é a batelada alimentada, por causa da adição intermitente de mosto sem renovação total do mesmo. As vantagens deste processo incluem: baixa pressão osmótica, redução de substrato e produtos finais de fermentação que inibem o processo, alta produtividade em etanol e diminuição do tempo de fermentação. A batelada alimentada tem sido reportada como um bom processo para produção de etanol quando dirigido com diferentes matérias-primas, como palha de milho e material derivado de papel reciclado (VARGA et al., 2004; BALLESTEROUS et al., 2002; SANCHEZ e CARDONA, 2008).

Tecnologias alternativas projetadas para remover continuamente o etanol do caldo fermentado têm sido investigadas desde os anos 90. Contudo, apenas poucos trabalhos têm abordado o problema com o controle dos processos do ponto de vista da engenharia, considerando o processo como um sistema de produção integrada e dinâmica, levando em conta mais do que uma única unidade de processamento; por exemplo, considerando as interações entre fermentação e reciclo de células (OCHOA et al, 2010). Para acertar no processo contínuo, vários processos adicionais são necessários, incluindo células de levedura imobilizada utilizando um carreador ou fermentador de leito fixo e recirculação de células utilizando um dispositivo de separação. Processos contínuos utilizando membranas, tanques de separação, centrífugas e leveduras de alta flocculação já foram estudados (DOMINGUES et al., 2000; KRISHNAN et al., 1999; SANCHEZ e CARDONA, 2008; NISHIWAKI e DUNN, 2005).

A fermentação contínua extrativa tem mostrado algumas vantagens como baixa geração de vinhaça devido à possibilidade de alimentação de melaços em concentrações mais altas, com custos reduzidos no tratamento de resíduos e com a potencialidade de eliminar uma coluna de destilação do processo (ATALA e FILHO, 2006). Na fermentação contínua flash, a performance de todo o processo é significativamente influenciada pelas relações entre variáveis do processo nas unidades de reação e separação (RIVERA et al., 2010).

Na fermentação semicontínua ou batelada repetida, a concentração de micro-organismos inicial é maior que em um processo em batelada simples e, conseqüentemente o tempo de fermentação menor. O substrato quase sempre está presente em maior quantidade e os nutrientes são consumidos mais lentamente. Em contrapartida, o produto é de alta qualidade e produzido em maior quantidade. Dentre as vantagens apresentadas por este processo pode-se destacar: (1) Uma porção da cultura é coletada em intervalos de tempos e o meio fresco é

adicionado à dorna; (2) Há uma variação no volume da cultura; (3) Não há necessidade de ter uma dorna separada para o inóculo, exceto no início; (4) Não é desperdiçado tempo entre os repetidos ciclos de fermentação para a limpeza e reesterilização da dorna; (5) Não é requerido muito controle de lavagem das dornas, utilização de biocidas; (6) Possibilidade de operar o fermentador por longos períodos (às vezes alguns meses) sem que seja necessário preparar um novo inóculo e (7) Possibilidade de aumentar a produtividade do reator apenas modificando a forma de operação. Dentre as desvantagens estão o risco de contaminação e mutação devido aos longos períodos de cultivos e as operações manuais. Além disso, são necessários reatores de volumes maiores e os custos de investimento são levemente mais elevados que a batelada simples (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

A técnica de reciclo de células por bateladas alimentadas sucessivas tem sido bastante aplicada no Brasil para produção de etanol por, aproximadamente, 70 a 80 % das destilarias (BRETHAUER e WYMAN, 2010). Dentre as vantagens do reciclo de células estão a redução de tempo requerido e custos resultantes do uso de nutrientes empregados na etapa de preparação do inóculo (SANDA *et al.*, 2011). Brethauer e Wyman (2010) ainda comentam que as bateladas sucessivas podem ser realizadas por, aproximadamente 200 vezes, levando à redução do consumo de carbono para crescimento celular, e ao mesmo tempo, aumentando a produtividade em etanol.

Outros autores, tais como Basso *et al.* (2008), comentam que a prática de reciclo de células no setor industrial brasileiro leva à menores tempos de fermentação, na ordem de 6 a 11 horas, devido à alta concentração de células dentro dos fermentadores (em torno de 10-17 % em base úmida). Observou-se que em altas densidades celulares, altas concentrações de etanol e reciclagem de células ocasionam à redução no crescimento microbiano, levando a um aumento do rendimento de açúcar em etanol, em torno de 90 – 92 % do valor teórico.

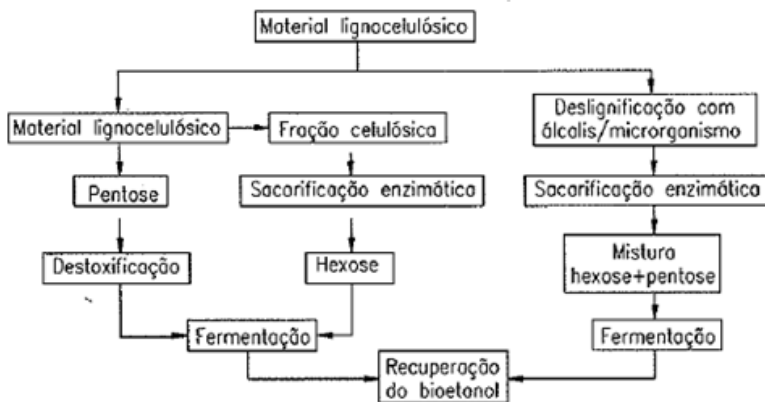
É importante ressaltar também que a prática de reciclo proporciona uma seleção das leveduras selvagens mais resistentes às condições estressantes do meio industrial, tais como alta concentração de etanol, altas temperaturas, estresse osmótico devido à presença de sais e açúcares, contaminações microbianas, acidez e outros (MIRANDA JÚNIOR *et al.*, 2009). Slininger *et al.* (2011) citam que o reciclo de células tem como contribuição a possibilidade de adaptação e condicionamento do micro-organismo ao processo. Assim, o reciclo de células pode servir como uma estratégia imposta ao processo, com objetivo de obter altos desempenhos. Porém a maioria das linhagens

mais resistentes não possuem características desejáveis para processos fermentativos, que seriam consumo total de substrato, não formação de espuma e flocos e alta produção de etanol.

Vale a pena lembrar que nos processos industriais brasileiros, os ciclos de células são mantidos por, aproximadamente, oito meses, durante toda a safra (BASSO *et al.*, 2008). Uma estratégia usada por Pereira *et al.* (2012) para manutenção de alta viabilidade e produtividade foi o monitoramento de viabilidade e quando essa alcançasse valores baixos (50%), realizava-se novo inóculo com concentração de 11 a 89 mg/mL, resultando em recuperação da produtividade. Assim, foram realizadas 15 bateladas sucessivas com produtividade em etanol na faixa de 3,45 a 4,59 g/(L.h).

Com o advento da produção de etanol 2G sugestões de novos nomes para os processos fermentativos em função da sua adaptação ao processo tem sido propostos. Destacam-se os processos: SHF – Separated Hydrolysis and Fermentation, SSF – Simultaneous Saccharification and Fermentation e S-SSF – Semi-Simultaneous Saccharification and Fermentation. No processo de Sacarificação e Fermentação Separadas (SHF), o sólido resultante do pré-tratamento após ser submetido às etapas posteriores de lavagem para remoção dos inibidores, é conduzido à etapa de hidrólise enzimática pela adição de enzimas celulolíticas. O hidrolisado resultante é convertido em etanol por leveduras de fermentação convencionais ou outros micro-organismos em potencial. Portanto, este processo possui etapas diferentes para a produção das enzimas, hidrólise da celulose e fermentação da glicose (Figura 13). A vantagem deste processo é que permite operar separadamente cada uma das etapas mencionadas, o que minimiza as interações entre as mesmas. Porém as enzimas celulase são inibidas pela acumulação dos açúcares, o que impede atingir concentrações razoáveis de bioetanol a altas taxas e com produções altas, mesmo usando grandes quantidades de enzimas (JOHANSSON *et al.*, 1993). O processo em separado apresenta vantagens como temperaturas da hidrólise enzimática e da fermentação podem ser otimizadas para cada etapa. A hidrólise enzimática é realizada por celulasas (endoglucanase e exoglucanase), que quebram a celulose em celobiose, e esta é, subsequentemente, convertida em duas moléculas de glicose pela β -glucosidase (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000). A principal desvantagem é a inibição pela celubiose e a contaminação devido ao elevado tempo envolvido na etapa.

Figura 13: Diagrama esquemático representativo das etapas do processo SHF.

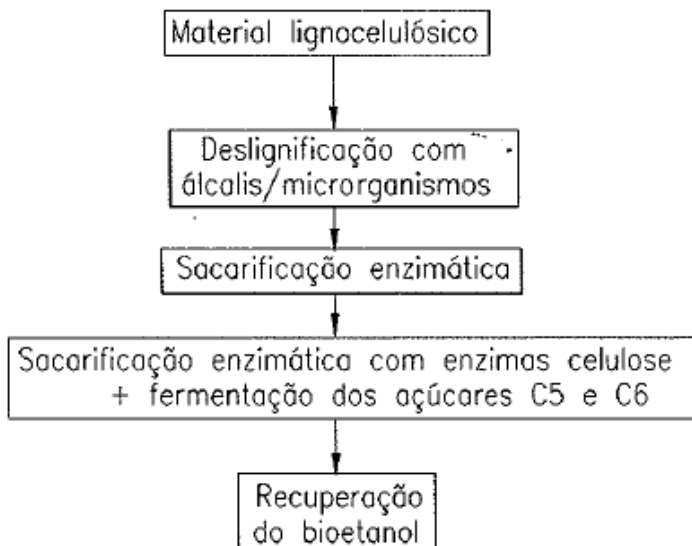


Fonte: Balat et al. (2008).

O processo SSF, onde a sacarificação e fermentação realizadas de forma simultânea proporciona algumas vantagens distintas sobre o processo SHF como o uso de um único reator para sacarificação e fermentação, mínimas chances de repressão catabólica, pois os açúcares liberados durante a hidrólise enzimática são simultaneamente fermentados pelos micro-organismos, simplicidade na operação, baixo investimento capital e melhoria da economia do processo (pois há diminuição do número de reatores). A agitação também é outra variável que requer uma condição intermediária. A sacarificação é realizada, geralmente, a 150 rpm. Contudo, o processo SSF requer otimização dos parâmetros como temperatura, pH e concentração de enzimas pois a temperatura ótima e máximo pH para a atividade catalítica da enzima e das cepas que fazem a fermentação são, geralmente, diferentes. Outra desvantagem é que no processo SSF a levedura não pode ser reutilizada devido à dificuldades operacionais de separação da levedura com a biomassa hidrolisada. O SSF tem sido experimentado para produção de etanol a partir de resíduos de frutas (OBEROI *et al.*, 2011; WILKINS *et al.*, 2007), mas não se tem ciência da produção comercial de etanol utilizando estes resíduos ou biomassa lignocelulósica. Apesar de algumas desvantagens, este tem sido o método preferido tanto em estudos de laboratório quanto em escala piloto. Da mesma forma que na concepção anterior, os açúcares provenientes da hemicelulose após o pré-tratamento podem ser convertidos a etanol em um fermentador separado (TAHERZADEH & KARIMI, 2008). Na Figura 14 apresenta-

se as etapas do processo de SSF com a fermentação de açúcares combinados.

Figura 14: Diagrama esquemático representativo das etapas do processo SSF.



Fonte: Balat et al. (2008).

RODRIGUES (2014) estudou a produção de etanol a partir de processos SHF e SSF do bagaço do pedúnculo do caju pré-tratado com ácido-álcali, utilizando *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907. Em processo SHF, realizado com enzimas do complexo Celluclast 1.5L a 60 FPU/g_{celulose}, hidrólise à 45 °C e fermentação à 40 °C, a autora obteve um rendimento de 0,43 g etanol/g_{glicose}. Realizando SSF da mesma biomassa lignocelulósica à 40 °C, utilizando celulases NS 22074 a 30 FPU/g_{celulose}, foi obtido um rendimento 0,49 g_{etanol}/g_{glicose} e uma eficiência de processo de 95,6%, demonstrando o potencial do processo SSF. DAHNUM et al. (2015) compararam processos SHF e SSF de resíduos do fruto da palmeira com *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores concluíram que o processo simultâneo (SSF) possui vantagens frente ao SHF, pois todo o processo ocorre a uma temperatura menor (menor gasto energético), como a produção de etanol ocorre com menor tempo, já que os processos de hidrólise e fermentação são simultâneos.

No processo SSF com 40 FPU/g_{celulose} os autores encontraram uma produção máxima de etanol de 6,05% $V_{\text{etanol}}/V_{\text{solução}}$, equivalendo a um rendimento teórico de 97% com 24 horas de processo, contra 4,72% de etanol e um rendimento teórico de 76% em processo SHF com 72 horas de fermentação, demonstrando a efetividade do processo SSF em detrimento do processo SHF.

O processo S-SSF possui as vantagens de ambos os processos SHF e SSF, utiliza uma pré-hidrólise antes da fermentação e não remove o substrato obtido depois da hidrólise para induzir o processo SSF. S-SSF compreende uma fase SSF e uma fase pré-hidrolítica a qual é conduzida sob condições ótimas para a pré-hidrólise enzimática. Dado que o processo S-SSF é uma combinação dos processos SHF e SSF, é esperado que o processo S-SSF apresente altas concentrações de etanol e altas taxas de conversão se for selecionado um tempo de pré-hidrólise adequado (SHEN e AGBLEVOR, 2010). S-SSF requer um tempo ideal para iniciar a fermentação para balancear os fatores inibitórios e de controle. A concentração de substrato não é tão alta em um processo S-SSF. Uma alta concentração de substrato durante a fermentação aumenta o aparecimento de substâncias inibitórias que reduz a produtividade em etanol (JORGENSEN *et al*, 2007).

2.8.4 Outros processos

Uma evolução do processo SSF é a inclusão da co-fermentação de substratos com múltiplos açúcares, permitindo o consumo de pentoses e hexoses no mesmo reator. Essa nova proposta tem sido denominada de processo SSCF – Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation e já foi testada em escala piloto. Micro-organismos tradicionais como *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*, usadas para a fermentação de etanol, não metabolizam pentoses. Promover a descoberta de leveduras fermentadoras de xilose tem atraído interesse na produção de combustíveis líquidos de materiais lignocelulósicos que possuem os dois açúcares promovendo melhor eficiência na fermentação. Portanto, para eficiente conversão de todos os açúcares em etanol, a co-fermentação de hexoses e pentoses em etanol é o principal alvo das pesquisas (YADAV *et al.*, 2011).

Para Hamelinck *et al.* (2005), o final da evolução da tecnologia parece ser o estabelecimento do bioprocesso consolidado (CBP – Consolidated Bio-Process), no qual as quatro transformações biológicas envolvidas na produção do etanol (produção de enzimas, sacarificação, fermentação de hexoses e fermentação de pentoses)

ocorrem em uma única etapa. Neste caso, segundo Wyman (2007), micro-organismos termofílicos necessitariam produzir anaerobicamente complexos enzimáticos (celulossomos) com melhor atividade celulolítica que as típicas enzimas de fungos e fermentariam todos os açúcares liberados no mesmo reator. De acordo com Lynd *et al.* (2005), um fenômeno que impacta sobre a performance desta configuração é a sinergia entre enzima e micro-organismo, a qual possibilitaria um aumento da eficiência da celulase na presença do complexo celulose-enzima-micro-organismo em comparação com os complexos celulose-enzima.

Conforme Seabra (2008), ainda não existem micro-organismos (ou combinações) capazes de produzir enzimas e etanol com os rendimentos requeridos, mas evoluções têm ocorrido. Apesar das expectativas, ainda não existe consenso sobre qual seria o melhor caminho para a redução dos custos de produção do etanol de 2G. Enquanto alguns pesquisadores acreditam que para alcançar o sucesso nesse processo a “chave” esteja na redução do número de etapas do processo, outros sugerem que o melhor seria buscar otimização dos reatores separadamente, por conta da diferença de condições ótimas de cada etapa e também por permitir um melhor controle do processo.

Independente do processo realizado, os produtos finais da fermentação são uma mistura de bioetanol, água e massa celular. O primeiro passo é a recuperação do bioetanol por meio de uma coluna de destilação (método mais utilizado). A recuperação de bioetanol nas colunas de destilação é fixado em 99,6% para reduzir as perdas do mesmo. Para se atingir concentrações acima do ponto azeotrópico, usam-se colunas de destilação extrativa (benzeno), secagem com dissecantes, ou a pervaporação (HAMELINCK *et al.*, 2005; BALAT *et al.*, 2008). Os sólidos são separados em uma centrífuga e secos em um secador rotatório. Uma fração do efluente da centrífuga (geralmente 25%) é retornado ao fermentador, o restante continua no processo de evaporação. O xarope, segundo Balat *et al.* (2008), tem um peso total de sólidos de 15-20%. O principal resíduo sólido é a lignina e sua quantidade depende de alguns fatores, como micro-organismo, tipo de processo e biomassa utilizada. A principal proposta para seu uso é a geração de vapor e eletricidade pela queima direta em caldeiras e centrais de cogeração.

2.9 Aspectos econômicos da produção de etanol 2G

Embora a biomassa lignocelulósica seja uma boa opção para a produção de etanol de segunda geração devido ao baixo custo e fácil acesso, a produção comercial de bioetanol em grande escala ainda não se implementou. De acordo com um estudo desenvolvido pelo departamento de Agricultura do Estados Unidos (ETHANOL STATISTIC, 2008), mesmo que os custos dos materiais lignocelulósicos sejam quase a metade dos não-lignocelulósicos, o custo global de produção do bioetanol celulósico ainda é muito alto quando comparado com o processo tradicional.

Um estudo realizado por Sassner et al. (2007), apresenta a avaliação técnico-econômica da produção de etanol 2G a partir de três tipos de materiais lignocelulósicos diferentes. Neste estudo foram usados dois materiais da indústria madeireira (abeto e salgueiro) e um resíduo agrícola do milho, os quais foram comparados em termos de custos de produção e demanda de energia usando o processo baseado no pré-tratamento com vapor catalisado com SO_2 , seguido de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). A avaliação econômica constituiu na estimativa dos custos de capital e os outros custos associados com o processo do bioetanol. Os custos dos maiores equipamentos do processo, como o reator de pré-tratamento, secador, caldeira a vapor e a máquina peletizadora, foram baseados em cotações dos vendedores. Os custos dos outros equipamentos (bombas, tanques, colunas, trocadores de calor, etc) assim como os equipamentos auxiliares (tubulação, material elétrico, instrumentação, etc) foram estimados usando-se o Avaliador de Processos Icarus (IPE) da tecnologia ASPEN. O custo anual de capital foi determinado multiplicando-se os investimentos de capital fixo por um fator de anuidade de 0,110, correspondente a um período de depreciação de 15 anos e uma taxa de interesse de 7%. O custo de produção por litro de etanol 2G produzido, assim como os custos totais e parciais são apresentados no Quadro 02. Aos sistemas de pré-tratamento e geração de vapor junto com os fermentadores SSF correspondem os maiores custos no valor de investimento total no caso-base sendo, respectivamente, 172,5, 158,4 e 162,7 milhões de dólares para salgueiro, resíduos de milho e abeto.

Quadro 02: Custos da produção de etanol 2G (por litro).

Matéria-prima		
Salgueiro	88,09	US\$/tonelada métrica seca
Resíduos de milho	78,89	US\$/tonelada métrica seca
Abeto	83,81	US\$/tonelada métrica seca
Rendimento do coproduto		
Combustível sólido	29,37	US\$/MWh
CO ₂	0,0048	US\$/kg
Reagentes químicos		
SO ₂	0,24	US\$/kg
NaOH (50%)	0,24	US\$/kg
NH ₃ (25%) ^a	0,32	US\$/kg
H ₃ PO ₄ (50%) ^a	0,79	US\$/kg
Desespumante	3,17	US\$/kg
(NH ₄) ₂ PO ₄ ^b	0,24	US\$/kg
MgSO ₄ .7H ₂ O ^b	0,70	US\$/kg
Melaço	0,16	US\$/kg
Enzimas	3,02	US\$/10 ⁶ FPU
Utilitários		
Eletricidade	47,62	US\$/MWh
Água de resfriamento	0,022	US\$/m ³
Água de processo	0,22	US\$/m ³
Outros custos		
Mão de obra	95238,1	US\$/empregado/ano
Seguros	1	% do capital fixo por ano
Manutenção	2	% do capital fixo por ano

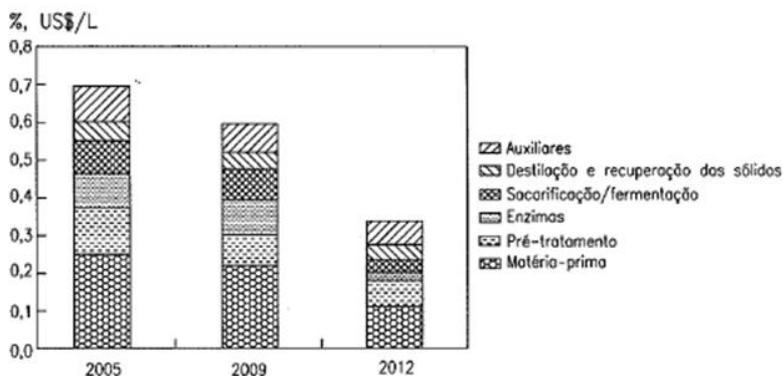
Fonte: Sassner (2007).

Um das primeiras barreiras econômicas seria o rendimento econômico marginal da produção do etanol, por exemplo, frente ao açúcar, que imporia mecanismos de suporte aos investimentos e aos mesmos subsídios permanentes aos produtores. Nas condições vigentes nos últimos anos, isso não parece ser relevante, pois este biocombustível tem se mostrado consistentemente viável frente à gasolina, quando remunerado ao nível do custo de oportunidade do açúcar, sendo ainda

mais atraente quando utilizados os melaços. Segundo Ramos (2008), no Brasil existe uma vasta biodiversidade e assim, uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais que podem ser bioprocessados para trazer benefícios socioeconômicos.

Nos últimos anos, o Brasil ocupa o quinto lugar entre os maiores produtores de etanol 2G do mundo, utilizando cana-de-açúcar como matéria-prima, que é mais eficiente para a produção de bioetanol que o milho. Os custos de produção no Brasil estão entre os mais baixos do mundo. Para a produção de etanol 2G no Brasil, os custos estão em torno de US\$ 1,50 por galão. Os fatores que favorecem a competitividade incluem as condições climáticas ideais, baixo custo de mão-de-obra, e uma infraestrutura bem madura construída durante ao menos 30 anos (BALAT *et al.*, 2008). Estudos demonstram que o etanol 2G na União Europeia torna-se competitivo quando os preços do petróleo alcançam US\$ 70 por barril, enquanto nos EUA torna-se competitivo a US\$ 50-60 por barril. Para o Brasil a barreira é mais baixa entre US\$ 25 e US\$ 30 por barril. O custo da geração de etanol 2G, por etapas de produção, para o período de 2005 à 2012 analisados pelo DOE são mostrados na Figura 15.

Figura 15: Custo de etanol 2G de 2005 à 2012.



Fonte: Ethanol Statistics (2008).

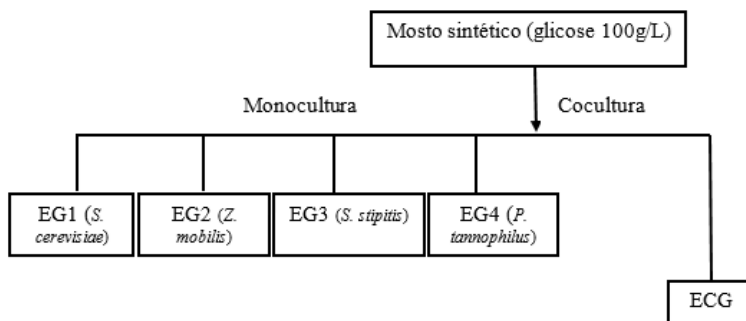
3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritas todas as condições experimentais bem como as técnicas analíticas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. A metodologia utilizada nos cálculos e as análises estatísticas também estão apresentadas para o entendimento dos valores calculados.

Os ensaios de fermentação realizados foram diluídos em dois grupos: fermentação de mosto sintético contendo glicose como fonte de carbono e fermentação de mosto complexo contendo como substrato Açúcares Redutores (AR) provenientes da sacarificação de pseudocaule de bananeira.

O fluxograma mostrado na Figura 16 apresenta os ensaios realizados com mosto sintético para seleção de micro-organismos visando a fermentação com cocultura.

Figura 16: Fluxograma dos ensaios em frascos de Erlenmeyer com mosto sintético empregando diferentes monoculturas microbianas (EG) e cocultura (ECG) formada por micro-organismos selecionados em EG.



Fonte: Primária (2017).

O fluxograma apresentado na Figura 17 mostra o número de ensaios realizados com mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado.

No Quadro 03 é mostrado o resumo dos experimentos apresentados neste trabalho com as principais condições operacionais.

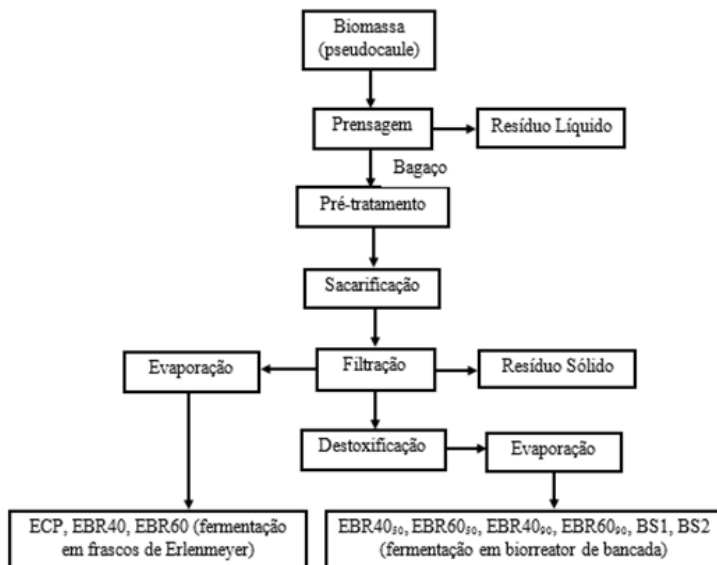
Quadro 03: Condições de cultivo dos ensaios EG1 a ECP.

	ENSAIOS					
	EG1	EG2	EG3	EG4	ECG	ECP
Condições de cultivo	EG1	EG2	EG3	EG4	ECG	ECP
Regime de operação	Batelada	Batelada	Batelada	Batelada	Batelada	Batelada
Frasco de cultivo	Erlem	Erlem	Erlem	Erlem	Erlem	Erlem
Volume de trabalho	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Mosto de cultivo	Sintético	Sintético	Sintético	Sintético	Sintético	Pseudocaule sacarificado
pH	4,5	6,0	5,5	6,0	5,0	5,0
Cultura	Monocultura	Monocultura	Monocultura	Monocultura	Cocultura (50:50)	Cocultura (50:50)
Destoxificação	não	não	não	não	não	não
Concentração celular no frasco de cultivo	1,5 g/L	1,5 g/L	1,5 g/L	1,5 g/L	3,0 g/L	3,0 g/L

Fonte: Primária (2017).

O fluxograma apresentado na Figura 17 mostra o número de ensaios realizados com mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado.

Figura 17: Fluxograma dos ensaios com mosto proveniente de pseudocaule de bananeira sacarificado.



Fonte: Primária (2017).

O Quadro 04, apresenta os experimentos apresentados neste trabalho com o resumo das principais condições operacionais.

Quadro 04: Condições de cultivo dos ensaios EBR40 a BS2.

Condições de cultivo	EBR40	EBR60	EBR40 ₅₀	EBR60 ₅₀	EBR40 ₉₀	EBR60 ₉₀	BS1	BS2
Regime de operação	Batelada repetida	Batelada repetida	Batelada repetida	Batelada repetida	Batelada repetida	Batelada repetida	Batelada sequencial	Batelada sequencial
Frasco de cultivo	Erlen	Erlen	reator	reator	reator	reator	reator	Reator
Volume de trabalho	100 mL	100 mL	1500 mL	1500 mL	1500 mL	1500 mL	1500 mL	1500 mL
Mosto de cultivo	Pseudocaulé sacarificado	Pseudocaulé sacarificado	Pseudocaulé sacarificado	Pseudocaulé sacarificado	Pseudocaulé sacarificado	Pseudocaulé sacarificado	Pseudocaulé sacarificado	Pseudocaulé sacarificado
pH	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Cultura	Cocultura (50:50)	Cocultura (50:50)	Cocultura (50:50)	Cocultura (50:50)	Cocultura (90:10)	Cocultura (90:10)	Monocultura	Monocultura
Destoxificação	não	não	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Concentração celular no frasco de cultivo	3,0 g/L	3,0 g/L	3,0 g/L	3,0 g/L	3,0 g/L	3,0 g/L	3,0 g/L	17,0 g/L

Fonte: Primária (2017).

3.1 Biomassa

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina do pseudocaule de bananeira *Musa cavendishii* determinados em estudo de Souza (2017) são mostrados na Tabela 07, juntamente com outros valores obtidos da literatura.

Tabela 07: Teores de celulose (cel), hemicelulose (hemi) e lignina (lig) em diferentes tipos de biomassa lignocelulósica.

Fonte: Souza, (2016)

Biomassa	cel (%)	hemi (%)	lig (%)	Referência
Pseudocaule (<i>Musa cavendishii</i>)	38,5	29,4	8,3	Souza (2016)
Pseudocaule (<i>Musa balbisiana</i>)	37	21,6	8,5	Gogoi et al. (2014)
Pseudocaule (<i>Musa acuminata</i>)	35,2	24,4	3,4	Ingale et al. (2014)
Palha da cana-de-açúcar	38	29	29	Silva (2009)
Bagaço de cana-de-açúcar	36,3	30,6	9,4	Pereira (2006)
Bagaço de cana-de-açúcar	40,5	28,8	10,7	Gomes (2013)
Bagaço de cana-de-açúcar	38,8	29,4	21,7	Wolf (2011)

Foi empregado o pseudocaule da bananeira *Musa cavendishii*, popularmente conhecida em Santa Catarina como “bananeira nanica”. O resíduo foi coletado na própria Universidade da Região de Joinville - Univille.

Após ser cortado em fatias de 30 cm de comprimento e espessura aproximada de 5 cm, o material foi prensado em prensa de cilindros (Figura 18) marca Hidro Industrial (modelo HB-350) para extração de seu líquido natural. Em seguida, o bagaço foi seco em secador de bandejas (Figura 19) marca COEL HW 500 com convecção forçada (velocidade do ar na entrada do secador de 2,6 m/s e na câmara de secagem igual a 0,22 m/s), a 60 °C durante 24 h. O teor de umidade do bagaço, após prensagem, ficou em torno de 35% (em base seca) e, após secagem, reduz para valores menores que 10%, conforme já estabelecido por Gonçalves Filho (2011).

A biomassa seca foi triturada em moinho de facas Solab com rotação de 1750 rpm até o tamanho máximo das partículas de 30 mesh (0,595 mm). O farelo (Figura 20) obtido foi submetido ao pré-tratamento químico seguido de sacarificação ou, então, armazenado em geladeira a 4 °C para posterior utilização. Após sacarificação, a mistura foi filtrada. O filtrado (caldo) foi aquecido para a evaporação com consequente aumento da concentração de açúcares redutores e então conservado em congeladores, até utilização como substrato da fermentação. O aproveitamento energético do resíduo sólido por meio da geração de biogás deverá ser avaliado em breve pelos pesquisadores da Univille.

Figura 18: Fotografia da prensa de cilindro para massas Hidro Industrial HB-350.



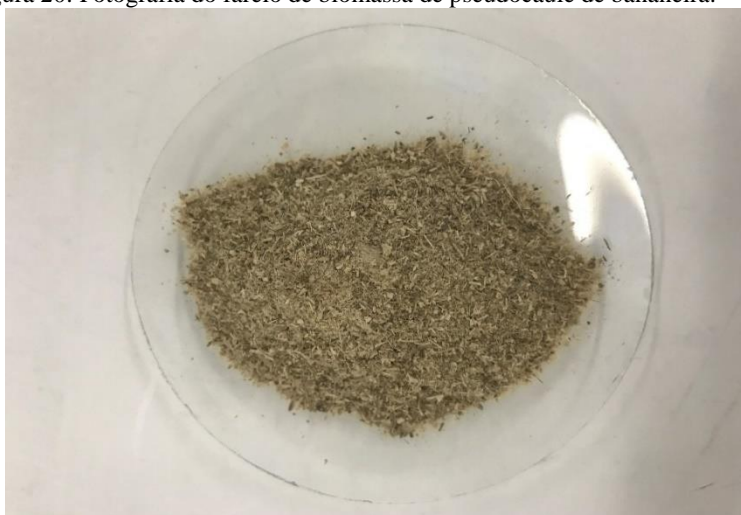
Fonte: Primária (2017).

Figura 19: Fotografia do secador de bandejas COEL HW 500.



Fonte: Primária (2017).

Figura 20: Fotografia do farelo de biomassa de pseudocaule de bananeira.



Fonte: Primária (2017).

3.1.1 Pré-tratamento químico

Empregou-se 7 g de farelo de pseudocaule contendo $9,7 \pm 0,1\%$ de umidade (umidade residual após etapa de secagem, determinado por gravimetria conforme definido por GONÇALVES FILHO, 2011). A concentração de biomassa seca (m_s) no frasco de reação (Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de mistura) foi de, aproximadamente, 70 g/L, conforme proposto por Souza (2016).

Para o pré-tratamento, seguindo a metodologia proposta por Souza (2015), utilizou-se a hidrólise ácida com H_2SO_4 concentrado na proporção de 2% m/m_s (1,4 g/L de H_2SO_4 na mistura reacional). A reação foi realizada em autoclave elétrica (sem agitação) a 121 °C por 15 min. Após pré-tratamento, o pH foi ajustado para 5,5 (solução de NaOH anidro) e a mistura foi conduzida à hidrólise enzimática (sacarificação).

3.1.2 Sacarificação

Para a sacarificação da biomassa pré-tratada foi utilizada uma solução aquosa composta das enzimas Celulase NS50013 e Hemicelulase NS22002 da Novozymes®. As respectivas concentrações das enzimas (6% m/m_s e 2% m/m_s), pH reacional (pH 5,5; tampão acetato de sódio/ácido acético 0,1 M), temperatura (45 °C) e tempo de reação (24 h), foram os mesmos utilizados por Gonçalves Filho (2011) conforme indicados pelo fabricante das enzimas.

Durante os experimentos, as enzimas foram conservadas em geladeira e apresentaram atividades em torno de 30 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ para celulase e de 1,5 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mL})$ para a hemicelulase. Como reator empregou-se frascos de Erlenmeyer de 2000 mL com 900 mL da mistura pré-tratada quimicamente, adicionada de 100 mL de solução enzimática. A reação enzimática foi conduzida sob agitação constante.

3.1.3 Filtração e concentração do caldo sacarificado

Após sacarificação, a mistura foi filtrada à vácuo e o filtrado foi submetido à evaporação aberta (pressão ambiente) em banho de aquecimento da marca Fisatom modelo 558 a 70 °C, com homogeneização constante a 150 rpm através de agitador portátil com pás de hélice até obter-se a concentração de açúcares redutores desejada. Para os ensaios indicados na Figura 17, as concentrações foram definidas de forma que, ao adicionar-se outros nutrientes no meio os

valores de AR (S_0) fossem da ordem de 100 g/L (ECP, EBR₄₀, EBR₆₀) e 150 g/L (EBR40₅₀, EBR60₅₀, EBR40₉₀, EBR60₉₀, BS1 E BS2). A princípio, uma maior concentração de açúcares redutores fermentescíveis possibilita a obtenção de uma maior concentração de etanol no caldo fermentado. As Figuras 21 e 22, a seguir, apresentam-se fotografias do licor não concentrado e concentrado.

Figura 21: Licor não concentrado de pseudocaule de bananeira.



Fonte: Primária (2017).

Figura 22: Licor concentrado de pseudocaule de bananeira.



Fonte: Primária (2017).

3.1.4 Destoxificação

A destoxificação do mosto sacarificado e concentrado foi realizada conforme sugerida por Souza (2016). A adsorção dos contaminantes (inibidores da fermentação alcoólica) foi feita por adsorção em carvão ativo da marca Merck adicionado ao mosto na proporção de 1% m/v. Análises químicas realizadas por Souza (2016) determinaram as concentrações de ácidos orgânicos, compostos fenólicos, furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e açúcares redutores presentes no licor após destoxificação. Estes resultados demonstraram uma remoção de compostos fenólicos (principais contaminantes) de aproximadamente 51% para a proporção 1% m/v de carvão ativo. Após mistura, os frascos foram incubados em agitador orbital Shaker Incubating LOGEN com frequência de agitação de 200 min^{-1} , $30 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 60 min, conforme indicado por Mussatto e Roberto (2004) e Ferreira (2013). Em seguida, o carvão foi removido por centrifugação (2218 g, 3500 rpm, centrífuga Modelo 280R) e o filtrado, congelado até fermentação.

3.2 Micro-organismos e manutenção

Foram avaliados, como micro-organismo da fermentação alcoólica, culturas puras das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CCT

0293 (ATCC 26603), *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*) CCT 2617 (ATCC 58376), *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 e da bactéria *Zymomonas mobilis* ATCC 3500; todas adquiridas junto à Fundação André Tosello, São Paulo.

A manutenção das cepas foi realizada através do cultivo de superfície em placas de Petri empregando meio sólido (20 g/L de Agar-ágar) e incubação a 30 °C durante 24 h, seguido de armazenagem em geladeira a 4 °C. No máximo, a cada quinze dias, as culturas foram reativadas através da re-inoculação da cultura em novas placas de Petri contendo o mesmo tipo de meio de manutenção.

Para cada um dos micro-organismos foram utilizados os nutrientes recomendados pela Fundação André Tosello, conforme mostrado na Tabela 08.

Tabela 08: Meios de cultivo sintético para os micro-organismos avaliados.

Nutrientes	Concentração			
	(g/L) <i>S. cerevisiae</i>	<i>S.</i> <i>stipitis</i>	<i>P.</i> <i>tannophilus</i>	<i>Z.</i> <i>mobilis</i>
Glicose	20,0	20,0	20,0	20,0
Extrato de Levedura	3,0	3,0	3,0	5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	-	5,0	1,0
K ₂ HPO ₄	1,0	-	1,0	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1	-	0,1	1,0
CaCl ₂	0,1	-	0,1	-
Peptona	-	5,0	-	-
Extrato de Malte	-	3,0	-	-

Fonte: Primária (2017).

3.3 Ensaios de fermentação

Foram desenvolvidos no laboratório de Biotecnologia I da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.

3.3.1 Preparo do inóculo

O inóculo foi produzido conforme sugerido por Schulz (2010). Cultura pura do micro-organismo mantida no banco de cepas da UNIVILLE, foi previamente cultivada em placa de Petri (30 °C, 24 h)

contendo meio de cultivo específico (Tabela 07) adicionado de 20 g/L de Ágar-Ágar. Em seguida, foi adicionado 5 mL de água destilada em cada placa e, após raspagem das colônias com auxílio de uma alça de platina, a suspensão microbiana foi coletada por pipetagem e utilizada como pré-inóculo em mosto de cultivo líquido (2 mL de pré-inóculo/100 mL de meio) contido em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram incubados em agitador orbital (*shaker*) da BIOTECH modelo CERTOMAT U, a 30 °C com frequência de agitação de 110 min⁻¹ durante 24 h.

Antes da inoculação dos frascos de fermentação, o inóculo foi padronizado a fim de que cada frasco recebesse massa celular suficiente para concentração inicial de micro-organismos (X_0) conforme planejado (3,0 g/L ou 17,0 g/L em massa seca).

Para a padronização com concentração de inóculo 3,0 g/L, a suspensão microbiana foi centrifugada e a massa celular adicionada de água destilada estéril em volume suficiente até absorbância suficiente para X_0 . Para tanto, foi utilizada curva de calibração (Equação 4) obtida em Espectrofotômetro Novaspec II LKB Biochrom com comprimento de onda de 570 nm, conforme descrito no Apêndice 01.

$$\text{Abs} = 0,823X + 0,043 \quad r^2 = 0,989 \quad (4)$$

Entende-se como X a concentração de células no inóculo após centrifugação e ressuspensão em água, suficiente para atingir X_0 no biorreator (ou frasco de Erlenmeyer). Para a padronização com concentração de inóculo 17,0 g/L, a suspensão microbiana foi centrifugada e ressuspensa em solução de sacarose 10%. Após foi liofilizada em liofilizador de bancada New Química 588 série LT.

3.3.2 Mosto sintético

O fluxograma apresentado na Figura 16, mostra os ensaios conduzidos com mosto sintético composto por glicose 100 g/L adicionado de outros nutrientes conforme proposto por Souza et al. (2012): 3 g/L extrato de levedura, 0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 K_2HPO_4 , 0,1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1 g/L CaCl_2 . Antes da inoculação, os mostos foram esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm, durante 15 min e deixados em câmara de fluxo laminar até atingir temperatura ambiente. A glicose foi esterilizada separadamente para evitar a reação de Maillard (complexação da glicose com as proteínas presentes no mosto de cultivo). Foram avaliadas duas diferentes concentrações de células no

início do processo: 1,5 g/L (Ensaio EG1, EG2, EG3 e EG4) e 3,0 g/L (Ensaio ECG, cocultura).

3.3.3 Mosto de pseudocaule da bananeira sacarificado

Mosto de pseudocaule concentrado foi adicionado de nutrientes, conforme proposto por Souza et al. (2012): 3 g/L extrato de levedura, 0,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 K_2HPO_4 , 0,1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1 g/L CaCl_2 . Antes da inoculação, os mostos foram esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm, durante 15 min e deixados em câmara de fluxo laminar até atingir temperatura ambiente. Assim como no caso do mosto sintético, o mosto de pseudocaule sacarificado foi esterilizado separadamente da solução de nutrientes. Para esses ensaios, a concentração total de células (cocultura) no início do processo foi de 3,0 g/L (Ensaio ECP, EBR40₅₀, EBR60₅₀, EBR40₉₀, EBR60₉₀, BS1) e 17,0 g/L (BS2).

3.3.4 Ensaio em Batelada

3.3.4.1 Mosto sintético

Inicialmente foram realizados quatro ensaios de fermentação empregando como principal fonte de carbono 100 g/L de glicose (Ensaio EG1, EG2, EG3 e EG4). Cada um dos algarismos acrescido aos nomes dos ensaios correspondeu a uma espécie de micro-organismo avaliado (1 = *S. cerevisiae*, 2 = *Z. mobilis*, 3 = *S. stipitis*, 4 = *P. tannophilus*). A temperatura de incubação (30 ° C) foi a mesma em todos os ensaios e o pH inicial, específico para cada micro-organismo (1 = 4,5, 2 = 6,0, 3 = 5,0, 4 = 6,0). Dois dos quatro micro-organismos utilizados nesses ensaios foram selecionados e compuseram outro ensaio (ECG) também empregando glicose 100 g/L como fonte de carbono. Neste caso, o pH de 5,5 definido conforme ensaios preliminares realizados por Just et al. (2015) apresentados no Apêndice 4. A definição dos micro-organismos foi baseada no crescimento, produção de etanol e condições semelhantes de cultivo, visando uma futura ampliação de escalas.

Em todos os mostos de cultivo foram utilizadas as mesmas concentrações dos nutrientes utilizados na obtenção do inóculo, com esterilização em autoclave a 121 °C durante 15 min. Os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL (100 mL de volume de trabalho) contendo 80% v/v de mosto (açúcar + nutrientes) e

20% v/v de inóculo. Os frascos foram acondicionados em *shaker* rotativo CERTOMAT U com frequência de agitação de 100 min^{-1} .

3.3.4.2 Mosto de pseudocaule sacarificado

Os micro-organismos utilizados na cocultura foram avaliados no ensaio com mosto de pseudocaule sacarificado (Ensaio ECP). A concentração do caldo foi de 100 g/L e foi realizada conforme descrita no item 3.1.3. A temperatura de incubação foi de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e o pH inicial foi de 5,5.

Assim como nos ensaios com mosto sintético em todos os meios de cultivo aqui empregados foram utilizadas as mesmas concentrações de com esterilização em autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min e os experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, nas mesmas condições operacionais.

3.3.5 Fermentações em Batelada Repetida

3.3.5.1 Ensaio em frascos de Erlenmeyer

Foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de volume de trabalho. Como inóculo foi utilizado 20% do volume de trabalho (v/v) com biomassa microbiana ($3,0 \text{ g/L}$) composta por 50% de *S. cerevisiae* e 50% de *P. tannophilus*. Foram realizados dois ensaios de fermentação com duplicata empregando incubadora *shaker* CERTOMAT U a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, pH inicial de 5,5 (sem controle) e com frequência de agitação de 100 min^{-1} . Foram avaliadas duas condições diferentes de condução do processo fermentativo em relação ao volume de “corte” (volume retirado de mosto fermentado seguido da reposição de mesmo volume de mosto fresco): 40% (EBR40) e 60% (EBR60). Como fonte de carbono foi empregado o mosto de pseudocaule sacarificado contendo AR suficientemente planejado para $S_0 = 100 \text{ g/L}$. Os ciclos das bateladas de cada um dos dois ensaios (número de cortes) foram repetidos três vezes.

3.3.5.2 Ensaio em biorreator de bancada

Foram conduzidos em biorreator Biostat B (B. Braun) com dorna de 2000 mL contendo 1500 mL de volume de trabalho (Figura 23). Como inóculo foi utilizado 20% do volume de trabalho (v/v). A temperatura do processo foi de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e o pH controlado em 5,5 com

adição de KOH 3 M. A frequência de agitação foi de 150 min^{-1} , realizada por três turbinas Rushton, de 50 mm de diâmetro, com seis pás planas, separadas por uma distância de 20 cm entre si. Os parâmetros de pH e temperatura foram monitorados através de sondas instaladas na tampa do reator. Foram avaliadas quatro condições diferentes de condução do processo fermentativo em relação ao volume de “corte com diferentes proporções de concentração de biomassa celular entre os micro-organismos do inóculo (cocultura *start*). Os volumes de corte de 40 e 60% foram definidos em virtude de estudos anteriores com processo em batelada repetida (SILVA, 2007). (1) Ensaio EBR40₅₀: corte de 40%, proporção de 50/50; (2) Ensaio EBR60₅₀: corte 60% e proporção 50/50; (3) EBR40₉₀: corte 40% e proporção 90/10; (4) EBR60₉₀: corte 60% e proporção 90/10. Como fonte de carbono foi empregado o mosto de pseudocaule sacarificado contendo 150 g/L de AR, destoxificado. Os ciclos das bateladas de cada um dos quatro ensaios foram repetidos três vezes.

Figura 23: Conjunto de equipamentos para realização dos experimentos em biorreator de bancada 2 L.



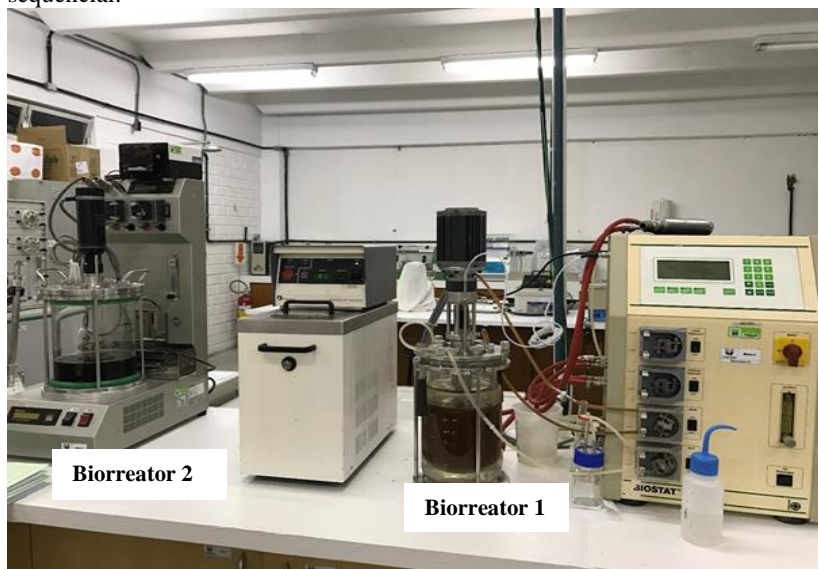
Fonte: Primária (2017).

3.3.6 Fermentação com cocultura em batelada sequencial

Foram realizados em dois biorreatores distintos (Figura 24): Biostat B da B. Braun (reator 1) e Liflas GP da Biotron (reator 2). No

biorreator 1 foi cultivado *S. cerevisiae* nas mesmas condições operacionais empregadas nos experimentos em batelada repetida (descritas no ítem 3.3.5.2). Quando a concentração de AR no biorreator 1 atingia em torno de 15 g/L, 80% do meio (1200 mL) era transferido para o biorreator 2 e re-inoculado com diferentes concentrações de *P. tannophilus*. Para o biorreator 2, também foram empregadas as mesmas condições descritas em 3.3.5.2, com exceção do sistema de agitação que foi realizada empregando uma turbina com seis pás planas (flute-blade) posicionadas rente ao fundo do biorreator. O objetivo destes experimentos foi avaliar o consumo de AR e produção de etanol quando o cultivo era conduzido em separado (primeiro para consumo das hexoses com *S. cerevisiae* e posteriormente para consumo das pentoses com *P. tannophilus*). Foram testadas duas condições de cultivo: (1) Ensaio BS1: concentração celular inicial de 3,0 g/L em ambos os reatores e (2) Ensaio BS2: concentração celular inicial de 17,0 g/L em ambos os reatores. Na Figura 24 é mostrado um ensaio de batelada sequencial.

Figura 24: Conjunto de equipamentos utilizados nos experimentos de batelada sequencial.



Fonte: Primária (2017).

3.4 Métodos Analíticos

De todos os ensaios de fermentação realizados foram retiradas amostras periódicas para as determinações das concentrações de açúcares redutores (AR) e etanol (P). Todas as amostras foram coletadas, no mínimo, em duplicata, (2 mL/amostra), transferidas para tubo Eppendorf e centrifugadas em Centrifuge 5415C com 12.000 min^{-1} (1774 g) durante 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de Eppendorf e congelado para posterior análise de AR e P.

3.4.1 Determinação de AR

Foi utilizado o método colorimétrico de DNS (3,5 dinitro salicilato) proposto por Miller (1959). A leitura de absorvância (Abs) foi feita em espectrofotômetro LKB BIOCHROM, Novaspec II, empregando comprimento de onda de 540 nm. O valor de AR foi determinado a partir da Equação 5, obtida de curva de calibração mostrada no Apêndice 1.

$$\text{Abs} = 0,6989\text{AR} - 0,0187 \quad r^2 = 0,9981 \quad (5)$$

Excepcionalmente para os casos da fermentação com mosto de pseudocaule (ensaios BS1 e BS2), analisou-se as amostras de AR em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para especificar as concentrações das hexoses (e dímeros) e das pentoses, principalmente no tempo inicial (t_0) e final (t_f) de cada ensaio. O objetivo deste procedimento foi diferenciar as concentrações de cada um desses carboidratos nas diferentes fases da fermentação. Para tanto, foi utilizado o cromatógrafo Merck Hitachi D-7000 IF equipado com detector de índice de refração Merck RI-71 e Coluna Ca SugarPak – Waters 30 cm. O eluente empregado foi água ultrapura (água Milli-Q) com fluxo de 0,5 mL/min.

3.4.2 Determinação de Etanol

As análises para determinar a concentração de etanol, no início ($t = t_0$) e no final ($t = t_f$) de cada etapa de fermentação, foram realizadas por cromatografia gasosa (CG). Foi empregado cromatógrafo da marca Agilent, modelo 6890, acoplado com amostrador automático da Agilent, modelo 7683 e coluna da Hewlett-Packard HP-1 de comprimento 50 m e diâmetro externo de 0,32 mm, com fase

estacionária 100% dimetil poli-siloxano e espessura de filme 1,05 μm . Para a análise as amostras já centrifugadas foram diluídas em água destilada e filtradas em microfiltros com porosidade de 0,45 μm . A concentração de etanol (P) foi calculada a partir de uma curva de calibração construída com padrões contendo o produto nas concentrações de (em g/L): 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0.

3.4.3 Cálculo dos parâmetros cinéticos de fermentação

Os valores do fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e da produtividade volumétrica em etanol (Q_P) foram obtidos de acordo com Schmidel et al. (2001) a partir das Equações 6 e 7, respectivamente:

$$Y_{P/S} = \frac{(P_f - P_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (6)$$

$$Q_P = \frac{(P_f - P_0)}{t_f} \quad (7)$$

Onde,

$Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em etanol (g/g);

Q_P – produtividade volumétrica em etanol (g/(L.h));

P_0 – concentração de etanol no início da fermentação (g/L);

P_f – concentração de etanol no final da fermentação (g/L);

S_0 – concentração inicial de AR (g/L);

S_f – concentração final de AR (g/L);

t_f – tempo de fermentação (h).

Para os ensaios de batelada, a grandeza t_f foi correspondente ao período de tempo necessário para que AR atingisse a menor concentração no mosto, coincidente com o início do período em que $d(\text{AR})/dt = 0$. Para os ensaios de batelada repetida t_f correspondeu ao tempo necessário para reduzir S_0 até S_f em cada um dos ciclos realizados (retirada de meio fermentado e reposição de igual volume de meio fresco). Para os ensaios com batelada sequencial, o valor de t_f foi semelhante ao considerado nos ensaios em batelada. Para determinar este tempo no biorreator 1, de forma a permitir uma rápida re-inoculação

do meio com o outro micro-organismo, as determinações de AR foram realizadas imediatamente após sua coleta.

3.4.4 Análises estatísticas

Os resultados obtidos nas fermentações foram analisados pelo método ANOVA com teste de Tukey para $p < 0,05$ empregando o programa computacional Origin 7.5. O objetivo do teste de Tukey foi determinar quais os grupos de amostras apresentaram diferença estatisticamente significantes.

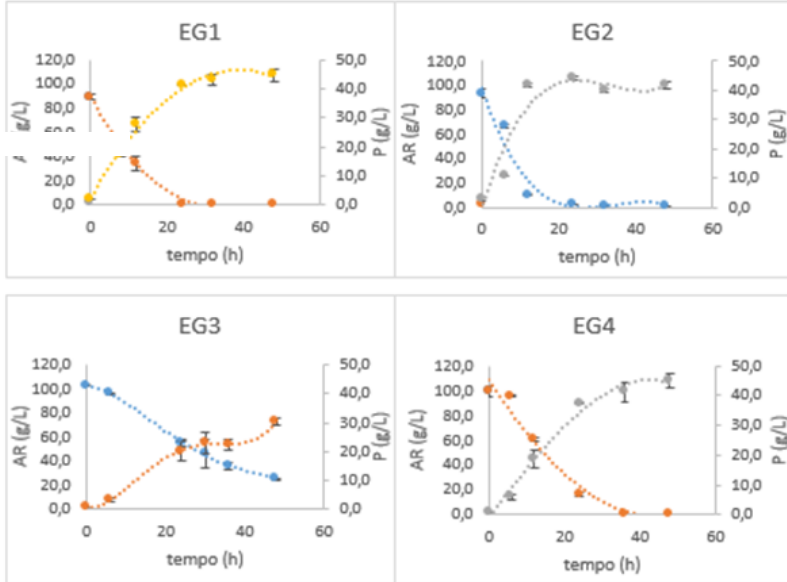
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados os resultados para a avaliação dos diferentes modos de condução de processo fermentativo para produção de etanol 2G utilizando os mostos de cultivo propostos. Em uma primeira etapa foram definidas as cinéticas de consumo de substrato e formação de produto pelas diferentes espécies de micro-organismos avaliadas e estabelecido o melhor consórcio de micro-organismos para fermentação por cocultura (para realizar simultaneamente o metabolismo de hexoses e pentoses). Em uma segunda etapa avaliou-se diferentes formas de regime de operação do biorreator visando incrementar o rendimento e a produtividade do processo.

4.1 Fermentação por monocultura em batelada simples

As cinéticas do consumo de substrato (AR: glicose) e formação de produto (P: etanol) relativas às fermentações por monocultura empregado como inóculo os micro-organismos *S. cerevisiae*, *Z. mobilis*, *S. stipitis* e *P. tannophilus* são apresentadas na Figura 25 (Ensaio EG – mosto sintético, $S_0 = 100$ g/L).

Figura 25: Cinéticas de consumo de substrato (AR) e acúmulo de etanol (P) durante a fermentação descontínua simples (batelada) de mosto sintético contendo glicose (100 g/L) e cultivo com monocultura de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603 (EG1); *Zymomonas mobilis* ATCC 3500 (EG2); *Scheffersomyces stipitis* ATCC 58376 (EG3); *Pachysolen tannophilus* ATCC 32691 (EG4). As barras de erro representam os desvios padrão das duplicatas.



Fonte: Primária (2017).

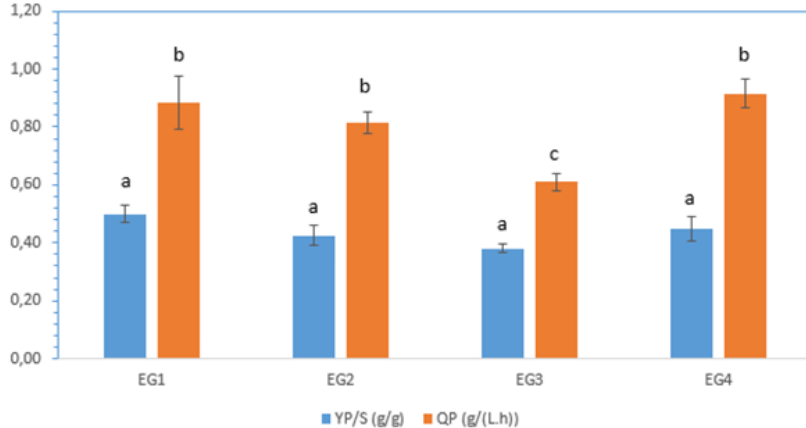
A partir da análise dos dados experimentais apresentados na Figura 25, pode-se observar que apenas para o caso do uso de cultura pura de *S. stipitis* ATCC 58376 (Ensaio EG3) a glicose inicialmente presente no meio de fermentação (ART \approx 100 g/L) não foi totalmente consumida até 48 h de fermentação, refletindo-se assim em um menor acúmulo de etanol no meio. Para os demais micro-organismos avaliados esse comportamento foi bem diferente, visto que, de 24 a 38 h de fermentação, o açúcar presente no meio foi totalmente exaurido. Em função disto, *S. stipitis* não foi selecionada para prosseguimento do estudo.

O comportamento cinético de *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* e *P. tannophilus* foram bastante semelhantes e apresentaram condições para serem indicados como “ideais” para o prosseguimento dos estudos visando a maximização da produção de etanol. No entanto, como

pretende-se, na continuidade deste estudo, avaliar a produção de etanol em diferentes formas de condução do processo fermentativo, a espécie *S. cerevisiae* torna-se, num primeiro momento, a mais atrativa que a cepa de *Z. mobilis*, visto que a cepa empregada (*S. cerevisiae* ATCC 26603), segundo informações do fornecedor, possui a característica de ser floculante e de possuir tolerância a altas concentrações de açúcar e de etanol, o que é desejável para processos fermentativos alternativos ao descontínuo simples.

Na Figura 26 é apresentado os valores obtidos do fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e produtividade em etanol (Q_P) dos experimentos com monocultura em mosto sintético, calculados a partir dos respectivos valores de S_0 , S_f , P_0 , P_f e t_f .

Figura 26: Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) obtidos na fermentação de mosto sintético por *S. cerevisiae* (EG1), *Z. mobilis* (EG2), *S. stipitis* (EG3) e *P. tannophilus* (EG4). Os valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% ($p < 0,05$). As barras de erros representam os desvios padrão das duplicatas.



Fonte: Primária (2017).

Para os micro-organismos tipicamente produtores de etanol convertendo hexoses, pode-se perceber que com exceção a *S. stipitis*, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os parâmetros cinéticos $Y_{P/S}$ e Q_P . Em função de apresentar propriedade floculante favorecendo o estudo futuro de outros processos fermentativos, além das avaliadas neste trabalho, como por exemplo, cultivo com alta densidade celular, definiu-se *S. cerevisiae* como um dos micro-organismos para compor a

cocultura desejada. O outro micro-organismo selecionado foi *P. tannophilus*, capaz de metabolizar hexoses, como *S. cerevisiae*, e pentoses. Além disso, realizar o consórcio de duas leveduras faz com que as condições operacionais sejam próximas e melhor controladas.

Uma série de autores vem testando a capacidade de diversos micro-organismos em processar altas concentrações de glicose para produção de etanol. Morais et al. (1993), estudaram a produção de etanol por *S. cerevisiae* LACI-delta em mosto de cultivo contendo sais e glicose (100 g/L), sem agitação e a 30 °C. A concentração de etanol atingida após 24 h de cultivo foi de 2,9 g/L. Najafpour et al (2004), obtiveram valores na ordem de 46 g/L de etanol em cultivo de *S. cerevisiae* ATCC 24860 imobilizada. A concentração de glicose foi de 150 g/L. Rieger et al. (1983), estudando o crescimento e produção em etanol de *S. cerevisiae*, alcançou valores de 20,5 g/L de etanol com 80 h de cultivo e concentração inicial de glicose na ordem de 80 g/L.

A bactéria *Z. mobilis* já foi exaustivamente estudada em relação a sua capacidade de produção de etanol. Ernandes e Garcia-Cruz (2009), avaliaram o efeito da concentração inicial de açúcares sobre a produção de etanol por várias linhagens de *Z. mobilis* e encontraram valores em torno de 60 g/L de etanol para a linhagem NRRL B 4286 com concentração inicial de glicose de 150 g/L. Morais et al. (1993) também estudaram várias linhagens de *Z. mobilis* e, após 24 h de cultivo com concentração inicial de glicose de 100 g/L, a linhagem que mais produziu etanol foi a Z-2-80 com 2,7 g/L. Para Ernandes e colaboradores (2007), a maior concentração de etanol foi de 76,6 g/L, a temperatura de 40 °C quando o meio de cultura foi composto de 25% de sacarose e com pH inicial de 8,0. Além disso, os resultados indicaram que as diferentes concentrações de sais minerais testados influenciaram significativamente na produção de etanol. Neste sentido, alguns autores (HEBLING, 1995; TANO E BUZATO, 2003; BORSANI, 2004) comprovaram que a bactéria *Z. mobilis* tem habilidade reduzida na produção de etanol a partir de melaços e resíduos agroindustriais quando comparada com outros substratos (mosto sintético e cana-de-açúcar).

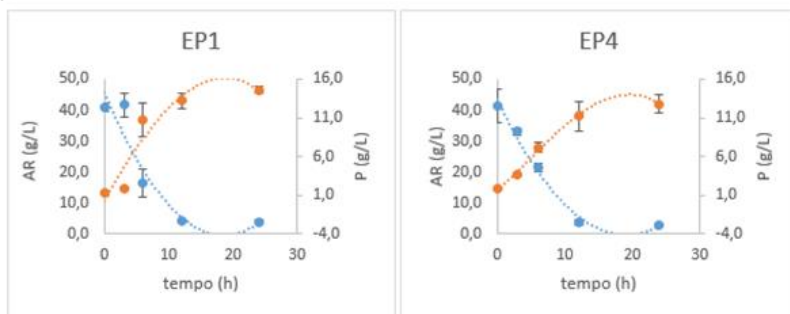
As leveduras *S. stipitis* e *P. tannophilus* têm sido exploradas pela sua capacidade de metabolizar não só as hexoses como também as pentoses. Agbogbo et al. (2006) demonstrou que a levedura *S. stipitis* pode transformar tanto glicose quanto xilose em etanol. Para glicose, os valores alcançaram uma concentração final de 22,7 g/L depois de 96 h de fermentação (60 g/L de glicose) e com xilose (60 g/L) a concentração de etanol foi de 24,3 g/L com o consumo total da fonte de carbono depois de 120 h. Para Karagöz e Özkan (2014), a concentração de etanol

obtida foi de 10,6 g/L para uma concentração inicial de glicose de 20 g/L.

P. tannophilus em estudo conduzido por Zhang e colaboradores (2008), fermentou glicose a 20 g/L atingindo uma concentração de etanol na ordem de 8 g/L em 60 h de processo batelada. A concentração de glicose chegou a zero em aproximadamente 12 h de fermentação. Para Sathesh-Prabu e Murugesan (2011), a levedura *P. tannophilus* produziu uma concentração de etanol de 40 g/L quando foi cultivada em meio com 150 g/L de glicose.

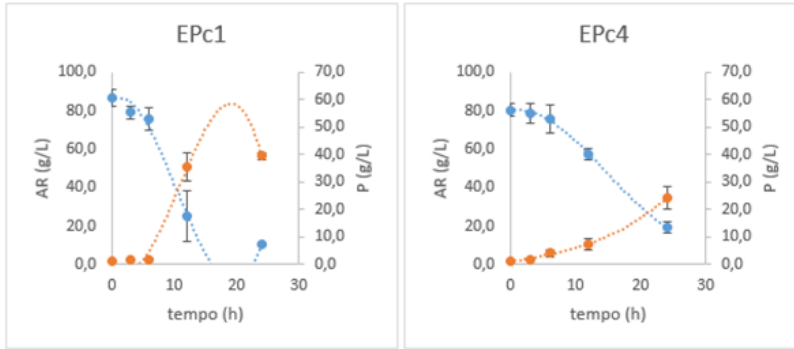
O comportamento cinético de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus*, empregados individualmente, como micro-organismo fermentador foi avaliado em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado não concentrado (50 g/L de AR) e concentrado (100 g/L de AR). Nas Figuras 27 e 28 é apresentado as cinéticas de consumo de glicose (AR) e formação de produto (P) para os micro-organismos *S. cerevisiae* (1) e *P. tannophilus* (4) para os casos de cultivo com mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado não concentrado (EP1 e EP4) e concentrado (EPc1 e EPc4).

Figura 27: Cinéticas de consumo de glicose (AR) e formação de produto (P) para o micro-organismo *S. cerevisiae* (1) para o cultivo com mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado não concentrado (AR = 50,0 g/L).



Fonte: Just (2015).

Figura 28: Cinéticas de consumo de glicose (AR) e formação de produto (P) para o micro-organismo *S. cerevisiae* (1) para o cultivo com mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado concentrado (AR = 100,0 g/L).



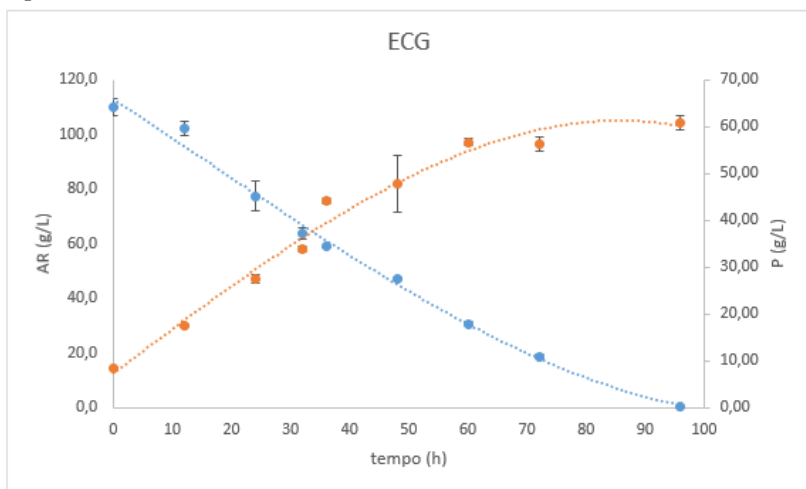
Fonte: Just (2015).

De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar que os comportamentos cinéticos dos dois micro-organismos para o mosto não concentrado foram muito semelhantes. No entanto, ao concentrar o mosto, *P. tannophilus* necessitou de mais tempo para metabolizar a mesma quantidade de AR consumida por *S. cerevisiae*, ou seja, apresentou menor velocidade do consumo do substrato e, conseqüentemente, menor velocidade de acúmulo de produto. Isto pode ter ocorrido em função de uma maior sensibilidade de *P. tannophilus* ao aumento do efeito inibidor de algum composto presente no mosto hidrolisado pela operação de evaporação para aumentar AR.

4.2 Fermentação com cocultura em processo batelada simples

Com a composição de micro-organismos da cocultura definida, tornou-se importante avaliar o comportamento do consórcio com mosto de cultivo sintético (glicose 100 g/L) e com mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado (AR 100 g/L). Nas Figuras 29 e 30 são apresentados os resultados da cinética de consumo de açúcares (AR) e produção de etanol (P) para os ensaios empregando cocultura microbiana de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus*.

Figura 29: Cinética de consumo de substrato (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana formada por *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* (50:50 em massa seca) na fermentação batelada em mosto sintético contendo 100 g/L de glicose. As barras de erro representam os desvios padrão das triplicatas.



Fonte: Primária (2017).

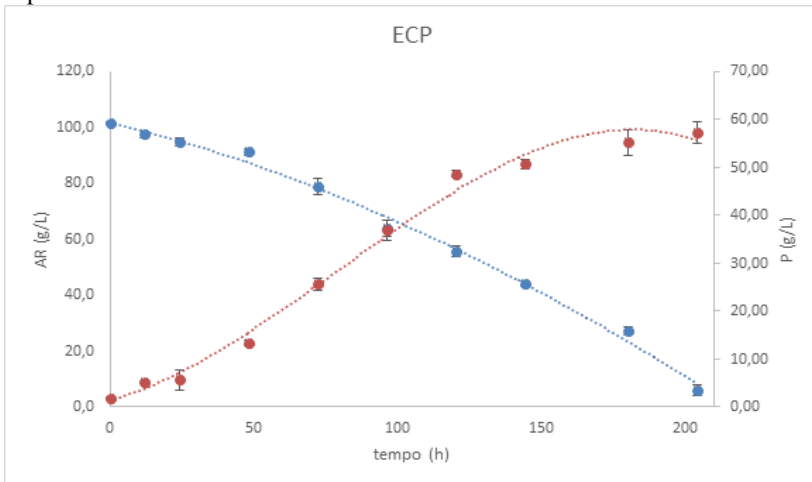
A partir da análise da Figura 29, pode-se perceber que a glicose foi totalmente consumida em torno de 98 h após o início do cultivo. O acúmulo de etanol neste período foi de 60,83 g/L, resultando em uma produtividade de 0,63 g/L.h. Comparando-se este valor com os da monocultura (EG1 e EG4) verifica-se que com a monocultura foi possível obter Q_P em torno de 30% maior. No entanto, a cocultura proporciona rendimento em etanol ($Y_{P/S} = 0,48$ g/g) 10% maior. Observa-se que, para o consumo da fonte de carbono, um tempo maior é requerido para a cocultura. Esta divergência nos tempos pode estar associada com o antagonismo microbiano entre as duas cepas, visto que *P. tannophilus* também é um consumidor de hexoses.

Em estudo semelhante, Karagöz e Özkan (2014) empregaram cocultura de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* para produção de etanol. Parte do estudo foi avaliar a performance da cocultura em meio sintético contendo 11 g/L de AR. Os autores conseguiram uma produção de etanol em torno de 5,5 g/L. Fu e Peiris (2008) avaliaram a influência do consórcio de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* frente a uma solução de glicose e xilose. A concentração inicial da mistura foi de 80 g/L e, após aproximadamente 150 h de cultivo, a concentração de AR chegou a zero

e a concentração de etanol em torno de 25 g/L. Para Cunha-Pereira et al. (2011), a mistura de AR era composta de glicose, xilose e arabinose com concentração inicial de 50 g/L (20 g/L de glicose, 20 g/L de xilose e 10 g/L de arabinose). A cocultura utilizada foi *Spathaspora arborarie* e *S. cerevisiae*. Os resultados determinaram um fator de conversão de substrato em produto de 0,77 g/g e um coeficiente de produtividade de 0,69 g/(L.h).

Em estudo recente, Ashoor et al. (2015) apresentaram os resultados obtidos do cultivo da cocultura de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* em frascos de Erlenmeyer. Dentre as várias linhagens testadas, a que apresentou melhores resultados exibiu uma concentração final em etanol de 8,92 g/L com uma produtividade de 0,186 g/(L.h) e fator de conversão de substrato em produto de 0,336 g/g. Culturas mistas de *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* foram testadas pela capacidade de produção em etanol com mosto sintético composto por saís, extrato de levedura e glicose na concentração de 200 g/L. Após 14 dias de cultivo (336 h), a glicose foi exaurida e a concentração final de etanol alcançou o valor de 80 g/L com produtividade de 0,24 g/(L.h) (YAMAOKA et al., 2014).

Figura 30: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR ●) e produção de etanol (P ●) empregando cocultura microbiana de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* na fermentação batelada de mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado sem destoxificação. As barras de erro representam os desvios padrão das triplicatas.



Fonte: Primária (2017).

Na Figura 30 pode-se observar que com 204 h de cultivo os açúcares redutores presentes ainda estão sendo, lentamente, consumidos; restando em torno de 10 g/L. A concentração máxima obtida em etanol foi de 57,4 g/L. O fator de conversão de substrato em produto foi de 0,57 g/g e a produtividade em etanol foi de 0,28 g/(L.h). A sobra de AR no mosto pode ter ocorrido devido à influência de compostos inibitórios presentes no hidrolisado não destoxificado de pseudocaule de bananeira (SOUZA et al, 2017), somado à conhecida inibição pela concentração de etanol.

Yadav e colaboradores (2011) estudaram o comportamento da cocultura composta de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* cultivados com hidrolisado de palha de arroz. Após a hidrólise, o caldo hidrolisado foi concentrado e destoxificado. A concentração inicial de AR ficou em torno de 30 g/L e a produção máxima em etanol foi de 7,5 g/L em 36 h de incubação com um fator de conversão de substrato em produto de 0,30 g/g e uma produtividade de 0,20 g/(L.h).

No cultivo conjunto de *Spathaspora arborarie* e *S. cerevisiae* utilizando como fonte de carbono hidrolisado de casca de arroz, Cunha-Pereira et al. (2011), alcançaram valores de fator de conversão de substrato em etanol de 0,62 g/g e produtividade de 0,25 g/(L.h). Karagöz e Özkan (2014) estudaram a produção de etanol empregando cocultura de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* e fonte de carbono proveniente de hidrolisado de palha de trigo. A concentração inicial de AR foi de 100 g/L e a concentração de etanol alcançada foi de 10,42 g/L. Ingale et al. (2014) também utilizaram em seus estudos hidrolisado de pseudocaule de bananeira e uma cocultura composta de *Aspergillus fumigatus/Aspergillus ellipticus* e *S. cerevisiae*. A máxima produção em etanol atingida foi de 17,1 g/L com uma produtividade de 0,24 g/(L.h).

Hickert et al. (2013) avaliaram a capacidade de produção em etanol da cultura mista de *S. cerevisiae* e *S. arborariae* com hidrolisado de cascas de arroz contendo 27 g/L de glicose, 13 g/L de xilose e 5 g/L de arabinose. A concentração de etanol ao final do cultivo (240 h) foi de 6 g/L. Os autores concluíram que *S. cerevisiae* provou ser um eficiente conversor de hexoses em etanol, enquanto que em cocultura com *S. arborariae*, pentoses e hexoses foram convertidos em etanol mostrando bons rendimentos.

Foi observado que a produtividade em etanol e o fator de conversão de substrato em etanol para este trabalho com cultivo de cocultura de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* utilizando hidrolisado de pseudocaule de bananeira alcançou valores equivalentes aos melhores resultados reportados na literatura conforme pode ser visto na Tabela 09.

Por vezes, os valores obtidos neste trabalho foram superiores em um dos parâmetros analisados ($Y_{P/S}$ e Q_P) ou nos dois.

Tabela 09: Comparativo entre valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de diversos autores e fontes de biomassa.

Biomassa	Mo's	$Y_{P/S}$	Q_P	Fonte
Pseudocaule de bananeira	<i>S. cerevisiae</i> e <i>P. tannophilus</i>	0,57	0,28	Este trabalho
Palha de arroz	<i>S. cerevisiae</i> e <i>S. stipitis</i>	0,30	0,20	Yadav et al. (2011)
Casca de arroz	<i>S. arborarie</i> e <i>S. cerevisiae</i>	0,62	0,25	Cunha-Pereira et al. (2011)
Palha de trigo	<i>S. cerevisiae</i> e <i>S. stipitis</i>	0,11	0,15	Karagöz e Özkan (2014)
Pseudocaule de bananeira	<i>A. fumigatus</i> e <i>A. ellipticus</i>	0,43	0,24	Ingale et al. (2014)
Cascas de arroz	<i>S. cerevisiae</i> e <i>S. arborarie</i>	0,13	0,10	Hickert et al. (2013)

Fonte: Primária (2017).

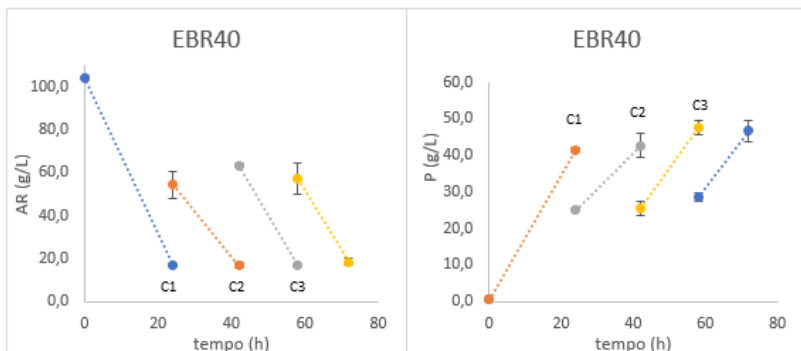
4.3 Fermentação alcoólica por cocultura em bateladas repetidas

4.3.1 Ensaios com mosto sacarificado de pseudocaule em frascos de Erlenmeyer

O processo batelada repetida utiliza-se de uma estratégia de substituição de 40 ou 60% do caldo no final da fermentação com o mesmo volume de meio fresco. Essa técnica é vantajosa pois remove a maior parte dos produtos inibitórios e produz células mais adaptadas que irão assegurar uma maior velocidade de utilização do substrato e produção do etanol (DISHISHA et al., 2015).

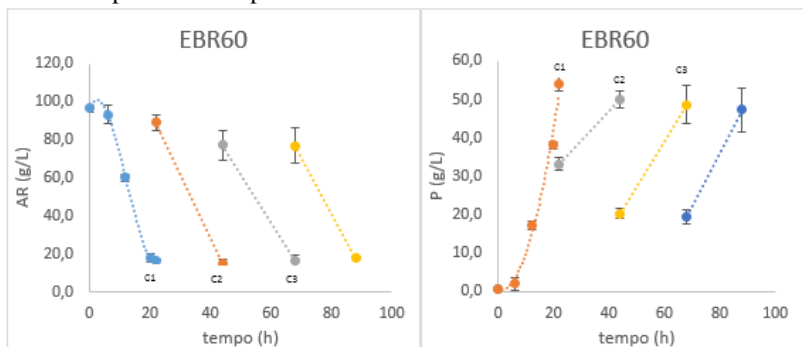
Nas Figuras 31 e 32 é apresentado as cinéticas de consumo de substrato e produção de etanol para os ensaios em regime de operação batelada repetida utilizando mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado não destoxificado com concentração de 100 g/L de AR. A concentração celular no início dos experimentos foi de 3,0 g/L. Na Figura 29, o corte dos experimentos foi de 40% e na Figura 30, de 60%.

Figura 31: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação batelada repetida com corte de 40% v/v. As barras de erro representam os desvios padrão das triplicatas.



Fonte: Primária (2017).

Figura 32: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação batelada repetida com corte de 60% v/v. As barras de erro representam os desvios padrão das triplicatas.



Fonte: Primária (2017).

Conforme pode ser observado nas Figuras 31 e 32 (assim como ocorreu no processo batelada), que tanto no processo com corte de 40% (EBR40) quanto no processo com corte de 60% (EBR60) não houve o consumo total da fonte de carbono (AR). As concentrações de produto (etanol) e o tempo de processo foram diferentes para cada

ensaio. As condições de processo bem controladas fornecem um claro efeito sobre o tempo de fermentação e a produtividade.

Para o ensaio EBR40, os tempos de fermentação para o consumo dos açúcares redutores (AR), foram diminuindo ao longo dos ciclos (24, 18, 16 e 14 h, respectivamente), possivelmente devido ao aumento do número de células. A produtividade em etanol (Q_P) foi significativamente maior ($p < 0,05$) no primeiro ciclo (0,69 g/(L.h)), diminuiu no segundo ciclo (0,61 g/(L.h)) e, a partir do segundo ciclo, passou a aumentar novamente para 0,63 g/(L.h) (terceiro ciclo) e 0,66 g/(L.h) (quarto ciclo) resultando numa produtividade média de $0,65 \pm 0,03$ g/(L.h). Comportamento semelhante foi observado para o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) resultando num valor médio de $0,54 \pm 0,04$ g/g.

No ensaio EBR60, foi observado tanto para a produtividade quanto para o fator de conversão de substrato em produto valores próximos entre os cortes. O resultado final de Q_P para este ensaio foi de $0,54 \pm 0,06$ g/(L.h) e o $Y_{P/S}$ foi de $0,60 \pm 0,08$ g/g. Mesmo com um fator de conversão em torno de 11% maior, a produtividade no ensaio EBR60 foi menor que no ensaio EBR40. O menor valor em Q_P foi devido a uma maior diluição do inóculo que permaneceu na dorna de fermentação após o corte. Acredita-se que outro fator que pode ter contribuído para essa menor produtividade esteja relacionado com os compostos inibitórios presentes no mosto de cultivo. Em EBR60, a concentração média de AR após cada corte (80 g/L) foi maior do que aquela observada em EBR40 (60 g/L). Concomitantemente, é esperado que a quantidade de compostos inibitórios em EBR60 também seja maior.

Comparando os resultados do processo batelada repetida (EBR40 e EBR60) com o processo em batelada (ECP) todos com cultivo de cocultura de *S.cerevisiae* e *P. tannophilus* com concentração celular inicial de 3,0 g/L, verifica-se que tanto o ensaio EBR40 quanto o ensaio EBR60 apresentaram valores superiores de Q_P . Para EBR40 este valor foi 132% maior e para EBR60 foi 93% maior que o processo ECP em batelada.

Ozmihci e Kargi (2007) avaliaram o processo de operação em batelada repetida para a produção de etanol empregando o micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* DSMZ-7239 e mosto de cultivo composto por soro de leite em pó. Foram testadas três diferentes concentrações de açúcares redutores: 50, 100 e 150 g/L. O tempo total de processo foi de 336 h com cinco ciclos de operação. Para a concentração de 100 g/L, o residual de açúcares ao final do quinto ciclo foi de 12,7 g/L gerando um fator de conversão de substrato em produto

de 0,52 g/g e uma concentração final (5º ciclo) de 68,0 g/L de etanol. Fan et al. (2013) utilizaram uma cepa tolerante de inibidores de *P. guilliermondii* e mosto de cultivo composto por hidrolisado de resíduos da cultura de milho. O modo de operação do processo fermentativo foi o de batelada repetida com cinco ciclos. Os valores encontrados para $Y_{P/S}$ e Q_P foram de 0,54 g/g e 0,45 g/(L.h), respectivamente. Os autores concluíram que a robustez da cepa combinada com a estratégia de fermentação otimizada (batelada repetida) sugere uma plataforma de produção de bioetanol simples e rentável.

Para Liu e colaboradores (2015), comparado com o processo de batelada simples a biomassa celular presente no processo de batelada repetida é invariante. Para cada batelada no processo de batelada repetida uma maior quantidade de células ativas reduz o tempo da batelada (ciclo) quando comparado com o processo de batelada simples. Como consequência, altas produtividades em etanol são alcançadas. Os autores desenvolveram os ensaios de batelada repetida com cinco ciclos e uma concentração inicial de glicose de 200 g/L e alcançaram valores de concentração de etanol em torno de 90 g/L. Também comentaram que o declínio da taxa de absorção de glicose limita a operação prolongada do processo em batelada repetida. Uma cepa recombinante de *S. cerevisiae* capaz de metabolizar glicose e xilose foi empregada no estudo do processo de fermentação em batelada repetida utilizando hidrolisado de resíduo de arroz contendo 12 g/L de glicose, 10 g/L de xilose, 4,72 g/L de frutose, 2,60 g/L de arabinose e 0,89 g/L de galactose. Depois de cinco ciclos, a concentração de etanol encontrada foi de 9,8 g/L. Os autores também relataram um declínio no consumo de açúcares após muitas repetições.

Kim et al. (2010) estudaram o processo de batelada repetida com uma mistura de glicose e xilose na concentração de 40 g/L. A cepa engenheirada de *S. cerevisiae*, capaz de metabolizar glicose e xilose, depois de quatro ciclos de processo, resultou numa produtividade de 0,59 g/(L.h) e um fator de conversão de substrato em produto de 0,35 g/g.

Estudos recentes têm sido desenvolvidos para testar o processo de batelada repetida tanto para a produção de etanol quanto para de outros produtos, confirmando que este tipo de modo de operação apresenta vantagens frente aos processos tradicionalmente empregados. Dentre eles pode-se citar El-Dalatony et al. (2016) que empregou o micro-organismo *Chlamydomonas mexicana* e mosto sintético contendo 20 g/L de glicose. A produção de etanol se deu em reator de leito imobilizado e por processo de batelada repetida com sete ciclos. Os

autores atribuem o sucesso dos experimentos tanto ao tipo de regime de operação empregado quanto à imobilização celular. Os resultados determinaram uma produtividade de 0,138 g/(L.h) e um fator de conversão em produto de 0,50 g/g. Santos et al. (2016) encontraram resultados promissores ao investigar a produção de etanol por *S. stipitis* utilizando como fonte de carbono xarope de cana-de-açúcar. Os experimentos foram conduzidos com em regime de operação batelada repetida com cinco ciclos e com uma concentração inicial de açúcares de aproximadamente 70 g/L. Os autores alcançaram uma produtividade em etanol de 0,54 g/(L.h), a mesma produtividade encontrada neste trabalho para um corte de 60%.

Ainda, Devarapalli et al. (2016) avaliaram o cultivo batelada repetida de *Clostridium ragsdalei* para a produção conjunta de etanol e ácido acético. Segundo o estudo, depois de 1662 h de cultivo e 19 ciclos, a concentração de etanol ficou em torno de 5,7 g/L. Em todos os estudos apresentados, os autores obtiveram resultados promissores para a produção rentável de etanol com a utilização do modo de operação em batelada repetida, tanto para mostos sintéticos quanto para mostos complexos dos mais diversos tipos de resíduos.

Não foram encontrados trabalhos associando o regime de operação em batelada repetida e cultivo de cocultura microbiana.

4.3.2 Ensaios em biorreator com mosto de pseudocaule destoxificado

Os produtos de degradação formados no pré-tratamento do material lignocelulósico depende tanto da biomassa vegetal quanto das condições utilizadas no pré-tratamento como temperatura, tempo de reação, pressão e pH. Os produtos da degradação dos açúcares – furfural e hidroximetilfurfural – são formados em altas concentrações durante condições severas de pré-tratamento ácido. A remoção destes e de outros compostos inibitórios do metabolismo microbiano pode ser realizada por extração em membranas de troca iônica, adsorção com carvão ativo ou tratamento com lacase e peroxidase (KLINKE et al., 2004).

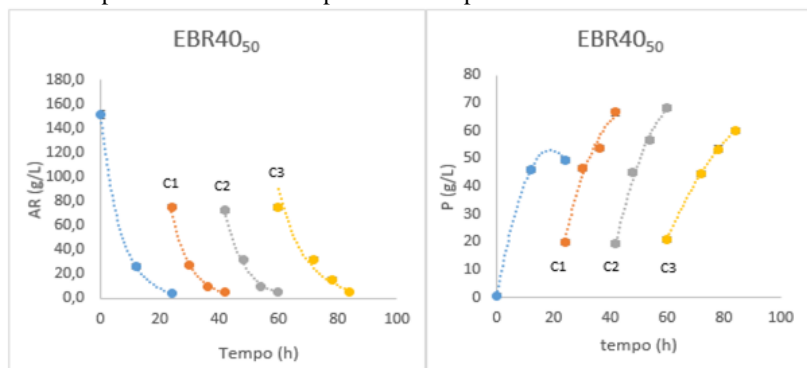
Cavka e Jönsson (2013) estudaram o tratamento de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e lascas de madeira com borohidreto de sódio. Os resultados mostraram que a destoxificação efetiva ocorre em condições suaves como temperatura ambiente e pH 6,0 para concentrações maiores que 50 mM de borohidreto. Mateo et al. (2013) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de carvão ativo na

remoção de compostos inibidores de hidrolisado de resíduos de poda de oliveira. Os autores encontraram uma taxa de remoção de 45% quando a concentração de carvão ativado foi de 8%.

Souza et al. (2017) estudaram o efeito da destoxificação utilizando carvão ativado sobre o hidrolisado sacarificado de pseudocaule de bananeira. Os autores testaram três diferentes concentrações de carvão ativado (1% m/v, 2% m/v e 4% m/v) e indicaram a utilização da concentração de 1% m/v, com remoção de 67% de ácido acético, 92% de compostos fenólicos e 78% de furfural; porém os autores chamaram atenção para a perda de AR. Durante o processo de destoxificação foi observado que juntamente com os inibidores houve a remoção de 17% de glicose, 16% de frutose, 17% de sacarose e 25% de xilose; valores estes considerados baixos pelos autores em comparação à remoção dos compostos inibitórios. Durante este estudo não foi detectado HMF (hidroximetilfurfural) na mistura, mesmo antes do processo de destoxificação. Isto pode ter ocorrido em função da baixa concentração de HMF no meio decorrente das condições pouco severas empregadas na hidrólise ácida (H_2SO_4 à 2%, 120 °C e 15 min) ou devido a interferentes que influenciaram nas interpretações dos cromatogramas (Apêndice 8). Diante deste cenário, os ensaios seguintes passaram pelo processo de destoxificação com carvão ativo a 1% m/v.

Nas Figuras 33, 34, 35 e 36 são mostrados os gráficos que apresentam os valores de consumo de AR e acúmulo de P para os ensaios EBR40₅₀, EBR60₅₀, EBR40₉₀ e EBR60₉₀. Em todos os experimentos foi utilizado mosto sacarificado de pseudocaule de bananeira para concentração inicial de AR (S_0) de 150 g/L e concentração celular inicial de 3,0 g/L. Os experimentos diferiram na proporção de micro-organismos utilizados no inóculo. Para os ensaios EBR40₅₀ e EBR60₅₀, a proporção foi 50% de *S.cerevisiae* e 50% de *P. tannophilus* enquanto para EBR40₉₀ e EBR60₉₀, a proporção foi 90% de *S.cerevisiae* e 10% de *P. tannophilus*. Os números 40 e 60 em cada ensaio corresponderam ao volume de corte (40 e 60% do volume de trabalho).

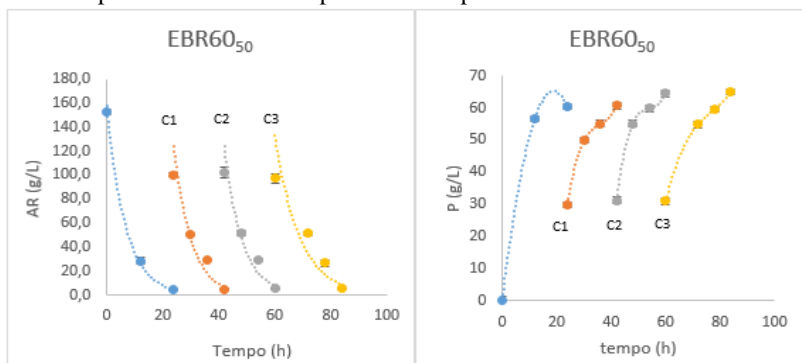
Figura 33: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana composta por 50% (em base de massa seca de células) de *S. cerevisiae* e 50% de *P. tannophilus* em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação batelada repetida com três cortes de 40% (C1, C2 e C3) do volume de trabalho. As barras de erro representam os desvios padrão das duplicatas.



Fonte: Primária (2017).

Pode-se perceber, pela observação do gráfico, que houve comportamento semelhante entre as velocidades de consumo de AR e formação de P entre os três cortes realizados. Entretanto, o tempo de fermentação necessário para exaurir AR após o terceiro corte (24 h) foi 6 h maior do que aquele determinado nos dois primeiros cortes. O tempo total de fermentação considerando a batelada inicial foi de 84 h. Os açúcares redutores foram prontamente metabolizados (96,7%) em todos os cortes. O fator de conversão se manteve praticamente constante no decorrer dos cortes ($Y_{P/S} = 0,41$ g/g) com produtividade média em etanol de $0,70 \pm 0,01$ g/(L.h). A concentração média de etanol obtida em todo o processo foi de $59,13 \pm 1,06$ g/L.

Figura 34: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana composta por 50% (em base de massa seca de células) de *S. cerevisiae* e 50% de *P. tannophilus* em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação batelada repetida com três cortes de 60% (C1, C2, C3) do volume de trabalho. As barras de erro representam os desvios padrão das duplicatas.

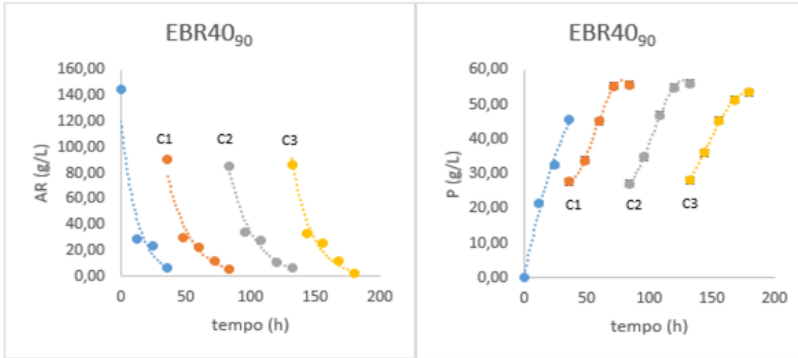


Fonte: Primária (2017).

Para o processo com cortes de 60% também houve comportamento semelhante entre as velocidades de consumo de AR e formação de P entre os três cortes realizados. Tanto as curvas de consumo de açúcares redutores quanto as de produção de etanol foram semelhantes com o ensaio EBR40₅₀. O tempo total de fermentação considerando a batelada inicial foi de 84 h. Os açúcares redutores foram prontamente metabolizados (96,5%) em todos os cortes. O fator de conversão se manteve praticamente constante no decorrer dos cortes ($Y_{P/S} = 0,45$ g/g) com produtividade média em etanol de $0,78 \pm 0,02$ g/(L.h). A concentração média de etanol obtida em todo o processo foi de $66,00 \pm 0,89$ g/L.

Comparando-se os resultados de EBR40₅₀ e EBR60₅₀, percebe-se um aumento tanto do fator de conversão (10%) quando da produtividade em etanol (12%) para o ensaio com corte de 60%. Essa maior produtividade do corte de 60% foi observada por Borzani et al. (1990). Não foram encontrados na literatura, trabalhos que relacionem a influência dos volumes de corte sobre o crescimento celular ou produtividade em etanol ou outro produto.

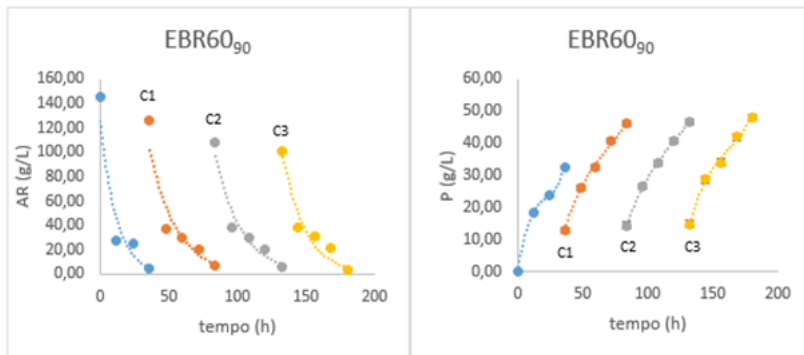
Figura 35: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana composta por 90% (em base de massa seca de células) de *S. cerevisiae* e 10% de *P. tannophilus* em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação batelada repetida com três cortes (C1, C2, C3) de 40% do volume de trabalho. As barras de erro representam os desvios padrão das duplicatas.



Fonte: Primária (2017).

Nos ensaios onde houve mudança na proporção de células no inóculo utilizado como cocultura *start*, não foi observado mudança do padrão de comportamento frente aos ensaios anteriores com proporção celular de 50:50. Porém, os tempos relativos à batelada inicial (36 h) e os sucessivos cortes (48 h/corte) foram bem superiores aos ensaios anteriores, com proporção de 50% entre os dois micro-organismos da cocultura perfazendo um total de 180 h de cultivo. Assim como em EBR40₅₀ e EBR60₅₀ os açúcares redutores foram prontamente metabolizados (98%) em todos os cortes. O fator de conversão ($Y_{P/S}$) se manteve praticamente constante no decorrer dos cortes, com valor médio de $0,38 \pm 0,05$ g/g. A produtividade em etanol se manteve constante em 0,30 g/(L.h). A concentração média em etanol foi de $53,47 \pm 0,55$ g/L.

Figura 36: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) empregando cocultura microbiana composta de 90% (em base seca de células) de *S. cerevisiae* e 10% de *P. tannophilus* em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação batelada repetida com três cortes (C1, C2, C3) de 60% do volume de trabalho. As barras de erro representam os desvios padrão das duplicatas.



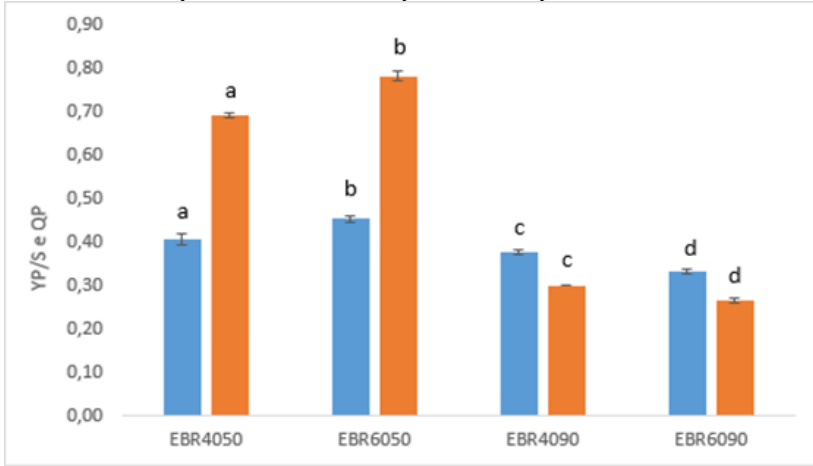
Fonte: Primária (2017).

Para o corte de 60%, o tempo total depois de 4 fermentações também foi de 180 h e, também o mesmo tempo entre os cortes foi observado (36, 48, 48 e 48 h). Tanto as curvas de consumo de açúcares redutores quanto as de produção de etanol foram semelhantes com o ensaio EBR40₉₀. Os açúcares redutores foram prontamente metabolizados (97,5%) em todos os cortes. O fator de conversão ($Y_{P/S}$) se manteve praticamente constante no decorrer dos cortes, com um valor médio de $0,37 \pm 0,05$ g/g. A produtividade em etanol se manteve constante em $0,27$ g/(L.h). A concentração média em etanol foi de $48,03 \pm 0,42$ g/L.

Comparando-se os resultados de EBR40₉₀ e EBR60₉₀, percebe-se que os valores de fator de conversão e produtividade em etanol foram respectivamente cerca de 12% e 11%, maiores para o corte de 40%.

Na Figura 37 é apresentado um gráfico comparativo dos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P dos ensaios em batelada repetida discutidos anteriormente.

Figura 37: Comparativo dos valores de $Y_{P/S}$ (●) e Q_P (●) dos ensaios EBR40₅₀, EBR60₅₀, EBR40₉₀ e EBR60₉₀. Os valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% ($p < 0,05$). As barras de erros representam os desvios padrão das triplicatas.



Fonte: Primária (2017).

Estatisticamente, todos os valores de $Y_{P/S}$ e Q_P diferem significativamente ($p < 0,05$) entre os ensaios. Percebe-se pela Figura 37 que os melhores resultados tanto de $Y_{P/S}$ quanto de Q_P foram obtidos em EBR60₅₀. Aliado a isso, nota-se que os resultados dos ensaios que empregaram uma proporção celular de 50:50 alcançaram melhores resultados que aqueles com uma proporção celular de 90:10.

Corroborando estes resultados, Karagöz e Özkan (2014) estudaram a proporção celular de cocultura de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* na produção de etanol a partir de hidrolisado de resíduo de palha de trigo. Os autores afirmam que *S. cerevisiae* possui uma melhor taxa de crescimento específico e utilização de substrato. Também não pode converter xilose em xilulose porém pode fermentar xilulose que pode ser produzida pelo micro-organismo que metaboliza xilose como *S. stipitis*. Por este motivo, os autores avaliaram diferentes proporções de cocultura de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* em regime de operação de batelada. Os resultados mais promissores foram encontrados quando a cocultura na proporção de 50:50 foi utilizada. A concentração de etanol neste caso foi de 11,55 g/L utilizando S_0 de 30 g/L. Ashoor et al. (2015) empregaram cocultura de *S. stipitis* e três diferentes cepas de *S. cerevisiae* (EC1118, 2168 e 49) e testaram as proporções mássicas no inóculo de 1:1, 5:1 e 10:1. O regime de operação foi de batelada. Os

pesquisadores encontraram melhores resultados em todas as combinações de cepas quando uma razão de 1:1 (50:50) foi utilizada. As concentrações em etanol nestes casos, variou de 7,6 a 8,9 g/L para S_0 de 30 g/L.

Os valores comparativos de tempo final de fermentação (t_f), concentração final de produto (P_f), $Y_{P/S}$ e Q_P dos ensaios com mosto sacarificado de pseudocaule de bananeira em regime de operação batelada (sem destoxificação), batelada repetida 60% (sem destoxificação) e batelada repetida 60% (com destoxificação) estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Valores de t_f , P_f , $Y_{P/S}$ e Q_P para os ensaios ECP, EBR60 e EBR60₅₀.

Ensaios	t_f (h)	P_f (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/(L.h))
ECP	204	57,4±2,26	0,57±0,01	0,28±0,01
EBR60	88	47,3±5,68	0,60±0,08	0,54±0,06
EBR60 ₅₀	84	66,0±0,89	0,45±0,01	0,78±0,02

Fonte: Primária (2017).

O menor tempo de fermentação foi do ensaio EBR60₅₀, bem como o fator de conversão de substrato em produto. Porém a concentração final de etanol e a produtividade em produto foram maiores para este ensaio. Um menor tempo de processo associado a altos valores de concentração final, levam a bons valores de produtividade que são requeridos para uma futura ampliação de escala e rentabilidade econômica. A produtividade do ensaio EBR60₅₀ foi 44% maior que o ensaio EBR60 e 178% maior que o ensaio ECP. A maior produtividade do ensaio EBR60₅₀ está associada ao processo de destoxificação e ao regime de operação que foi a batelada repetida com corte de 60%.

Vários autores em seus estudos para obtenção de etanol compararam o processo batelada simples com outros tipos de regimes de operação, porém em nenhum destes estudos foi utilizado cocultura microbiana. Lui et al. (2015) comparou os regimes de operação em batelada e batelada repetida de levedura floculante com concentração inicial de glicose de 200 g/L. Os pesquisadores concluíram que o processo de batelada repetida é superior ao processo de batelada simples desde que a biomassa seja reutilizada. Sanda et al. (2011) testaram o processo de batelada e batelada repetida com *S. cerevisiae* e fonte de carbono resultante de hidrolisado de palha de arroz. Os resultados também indicaram a batelada repetida como melhor método para obtenção de etanol frente ao processo batelada.

Fan e colaboradores (2013), empregaram a cepa *Pichia guilliermondii* e fonte de carbono de resíduos da lavoura do milho. Com uma estratégia otimizada de batelada alimentada, a máxima concentração em etanol e produtividade foi de 46,3 g/L e 0,47 g/(L.h), respectivamente. Para aumentar ainda mais a produtividade em etanol, o processo batelada foi repetido três vezes com reciclo de células e a concentração máxima em etanol e sua produtividade alcançaram valores de 51,2 g/L e 1,11 g/(L.h), respectivamente. Os autores consideraram o sistema promissor para a produção comercial.

Chang et al. (2012), compararam as condições ótimas de máxima produtividade em etanol proveniente de hidrolisado celulósico para os processos de batelada e batelada alimentada. Para o processo de batelada uma concentração final de etanol de 23 g/L foi alcançada. Já para o processo de batelada alimentada este valor foi de 32,3 g/L. Os resultados indicam que o processo de batelada alimentada é superior ao processo de batelada simples. Outros autores, testaram a produção de etanol utilizando como fonte de carbono suco de sorgo doce em diferentes concentrações e dois diferentes regimes de operação: batelada simples e batelada alimentada. O processo em batelada resultou numa concentração em etanol de 32 g/L. O processo em batelada alimentada apresentou uma concentração similar porém aumentou em 51% a produtividade.

Pode-se perceber que, em todos os estudos, os processos de batelada alimentada e batelada repetida foram superiores à batelada em relação à produtividade em etanol. Para os cultivos com coculturas, a forma de fermentação depende dos micro-organismos no sistema. Alguns autores encontraram resultados que mostram uma baixa utilização de xilose (6%) nas condições de batelada, enquanto que as condições contínuas favorecem a conversão simultânea (LAPLACE et al., 1993).

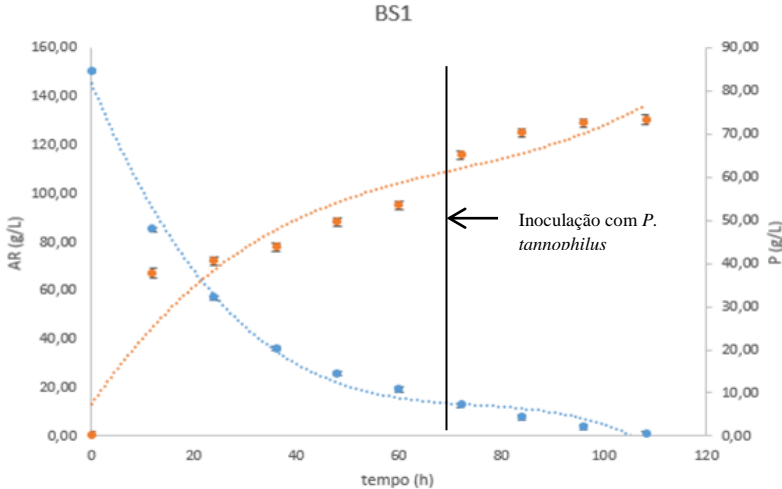
4.4 Fermentação alcoólica por cocultura de leveduras em batelada sequencial

Sabe-se que os açúcares que compõe os hidrolisados de material lignocelulósico são, em sua maior parte, glicose e xilose. Nos últimos anos, micro-organismos recombinantes que podem realizar esta conversão em algum grau foram estudados. De qualquer forma, o uso destes micro-organismos em escala industrial necessita de aumento da confiabilidade de todo o processo e superação das preocupações do público com micro-organismos recombinantes. Também, coculturas de

leveduras nem sempre garantem a conversão total das pentoses por causa do comportamento diauxico das leveduras fermentadoras de pentoses e da competição por oxigênio destas leveduras com as leveduras fermentadoras de hexoses (FU et al., 2008; BOTHAST et al., 1999; DE BARI et al., 2004).

Assim, o regime de operação de batelada sequencial pode ser uma opção promissora para aproveitar ao máximo dos micro-organismos fermentadores de glicose e xilose. Desta forma, foram testados os micro-organismos *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* cultivados separadamente em dois tanques ligados em série (batelada sequencial). Para este tipo de processo, primeiramente faz-se o cultivo do micro-organismo *S. cerevisiae* em um tanque e, quando a concentração de AR atinge o valor de 15-20 g/L, o volume do primeiro tanque é transferido para um segundo tanque, onde é feita a inoculação do micro-organismo *P. tannophilus*. O ensaio BS1 empregou concentração celular de 3,0 g/L em cada tanque e concentração inicial de açúcares redutores de 150 g/L no primeiro tanque. Os açúcares redutores foram provenientes do hidrolisado sacarificado de pseudocaule de bananeira destoxificado. O ensaio BS2 foi conduzido nas mesmas condições porém com concentração celular de 17 g/L em cada tanque. Nas Figuras 38 e 39 é mostrado as curvas de consumo de açúcares redutores (AR) e produção de etanol (P) para os ensaios de batelada sequencial.

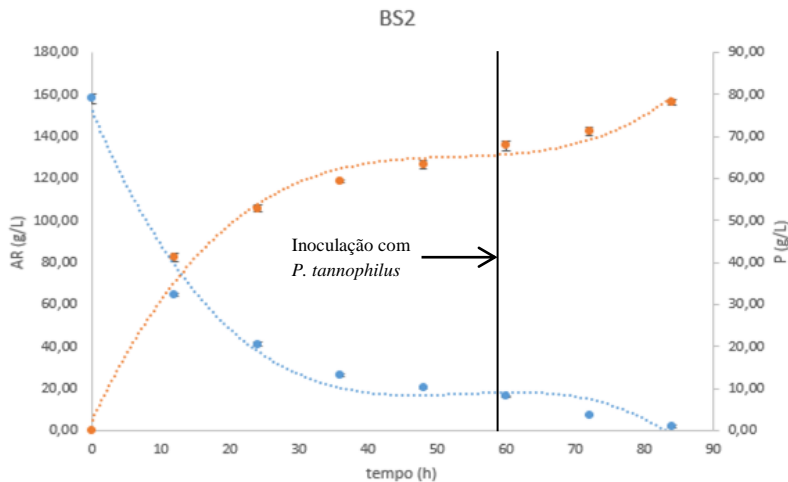
Figura 38: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR ●) e produção de etanol (P ●) empregando cocultura microbiana de *S. cerevisiae* (3,0 g/L) e *P. tannophilus* (3,0 g/L) em mosto de pseudocaule de bananeira sacarificado empregando regime de operação de batelada sequencial. As barras de erro representam os desvios padrão das duplicatas.



Fonte: Primária (2017).

De acordo com a Figura 38, os açúcares redutores foram totalmente consumidos dentro de 108 h de cultivo. Quando a concentração de açúcares redutores foi de aproximadamente 15 g/L, foi iniciada a transferência de 80% (1200 mL) do conteúdo do primeiro tanque para o segundo tanque e realizado a inoculação de *P. tannophilus*. A partir deste ponto ($t = 72$ h) o consumo das pentoses levou 36 h para chegar a zero. A concentração de etanol ao final dos ciclos foi de 73,33, g/L com uma produtividade de 0,80 g/(L.h).

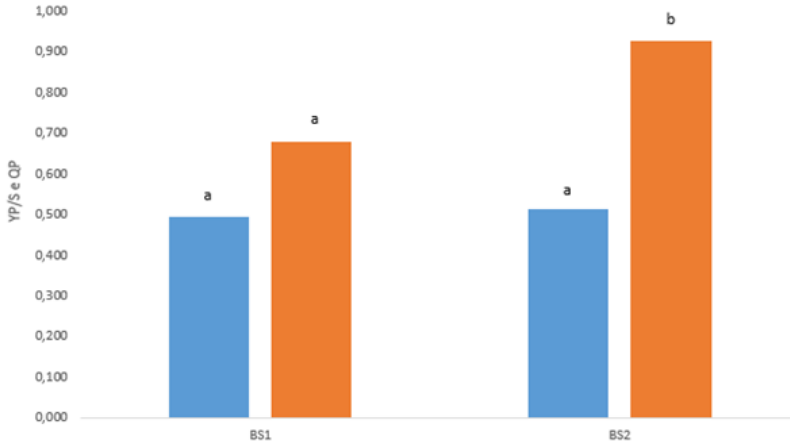
Figura 39: Cinética de consumo de açúcares redutores (AR ●) e produção de etanol (P ●) empregando cultura microbiana de *S. cerevisiae* (17,0 g/L) e *P. tannophilus* (17,0 g/L) em mosto de pseudocaulo de bananeira sacarificado empregando regime de operação de batelada sequencial. As barras de erro representam os desvios padrão das duplicatas.



Fonte: Primária (2017).

O ensaio BS2 foi conduzido da mesma forma que o ensaio BS1, porém a concentração celular no início do experimento foi cerca de 400% maior. O consumo total de açúcares redutores se deu em 84 h. Tratando-se somente do consumo das pentoses, o tempo foi de 24 h, 12 h a menos que o ensaio BS1. A concentração de etanol chegou a 78 g/L e a produtividade foi de 0,93 g/(L.h) ao final dos ciclos. Estes valores foram respectivamente 6 e 16% maiores que o ensaio BS1. Apesar do aumento nos valores de concentração e produtividade, esperava-se melhores resultados pois a concentração celular recebeu um considerável incremento do ensaio BS1 para o ensaio BS2. Apesar da maior concentração celular em BS2, pode ter ocorrido a inviabilização de parte da biomassa devido ao processo de liofilização utilizado para conservação. Na Figura 40 apresenta-se um gráfico comparativo entre os dois ensaios em relação ao fator de conversão ($Y_{P/S}$) e à produtividade (Q_P).

Figura 40: Comparativo dos valores de $Y_{P/S}$ (●) e QP (●) dos ensaios BS1 e BS2. Os valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% ($p < 0,05$). As barras de erros representam os desvios padrão das triplicatas.



Fonte: Primária (2017).

Grootjen et al. (1991), estudaram a influência da inoculação tardia de *S. cerevisiae* em um leito imobilizado de *P. stipitis*. A inoculação foi realizada após 100 e 200 h de cultivo de *P. stipitis*. O tempo total de cultivo em ambos os casos foi de 600 h e os autores constataram que a inserção de *S. cerevisiae* após 200 h de cultivo aumentava a concentração de etanol em cerca de 20%. Tantipaibulvut et al. (2015) avaliaram o tempo de inoculação de *Bacillus subtilis* em cultura de *S. cerevisiae* em um tempo total de cultivo de sete dias. Uma concentração de etanol de 4,8 g/L foi alcançada quando a inoculação de *B. subtilis* ocorreu um dia antes do cultivo com *S. cerevisiae* e uma concentração de etanol de 1,0 g/L com inoculação de *B. subtilis* dois dias antes.

Para estabelecer um sistema de produção de etanol eficiente a partir de resíduos de casca de arroz, Li e colaboradores (2011) empregaram um sistema de cultura sequencial de *S. cerevisiae* e *P. stipitis* com desativação pelo calor de *S. cerevisiae* antes da inoculação de *P. stipitis*. Os ensaios apontaram que após o início dos experimentos o tempo ideal de inoculação de *P. stipitis* foi de 26 h, precedido de 6 h de desativação da cepa de *S. cerevisiae* a 50 °C. A concentração de etanol atingida após 110 h de cultivo foi 15 g/L maior para o cultivo sequencial e de 10 g/L para o cultivo com monocultura de *S. cerevisiae*.

nas mesmas condições. Singh et al. (2014) investigaram uma técnica de cocultura sequencial de *P. stipitis* e *Z. mobilis* utilizando hidrolisado de grama Kans. O consumo total de açúcares redutores totais depois de 80 h de cultivo foi de 97,2% e a inoculação de *Z. mobilis* foi realizada 56 h depois do início do cultivo. A concentração final de etanol foi de 57,8g/L, cerca de 7% menor que o ensaio utilizando mosto sintético.

Os valores comparativos de tempo final de fermentação (t_f), concentração final de produto (P_f), fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e produtividade em produto (Q_P) dos ensaios com mosto sacarificado de pseudocaule de bananeira em regime de operação batelada (sem destoxificação), batelada repetida 60% (com destoxificação) e tanques em série (com destoxificação) estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de t_f , P_f , $Y_{P/S}$ e Q_P para os ensaios ECP, EBR60₅₀ e BS2.

Ensaio	t_f (h)	P_f (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/(L.h))
ECP	204	57,4±2,26	0,57±0,01	0,28±0,01
EBR60 ₅₀	84	66,0±5,68	0,45±0,08	0,78±0,06
BS2	84	78,0±0,67	0,50±0,01	0,93±0,01

Fonte: Primária (2017).

Os menores tempos de fermentação foram dos ensaios EBR60₅₀ e BS2, bem como o fator de conversão de substrato em produto. Porém a concentração final de etanol e a produtividade em produto foram maiores para o ensaio BS2 que para o ensaio EBR60₅₀. Para que se tenha uma boa produtividade em etanol é importante que o processo apresente robustez e qualidade tanto em escala laboratorial quanto em escala industrial. A produtividade do ensaio BS2 foi 19% maior que o ensaio EBR60₅₀ e 232% maior que o ensaio ECP. O sistema de cocultura ideal combina micro-organismos que não afetam as atividades metabólicas um do outro como crescimento, e a competitividade pelo substrato devem ser mínimas para maximizar a produtividade.

A inibição do metabolismo de absorção de xilose, pelos micro-organismos fermentadores de pentoses, por repressão catabólica na presença de altas concentrações de glicose e a inibição por etanol devido a rápida produção de etanol pelos micro-organismos fermentadores de hexoses, são os maiores problemas relatados nos sistemas de cocultura existentes onde estes micro-organismos são cultivados simultaneamente. As contramedidas utilizadas para contornar esses problemas é o uso da adição sequencial das culturas em seus

respectivos mostos e carboidratos. Visto que a cocultura simultânea pode gerar este tipo de empecilho e prejudicar a produtividade em etanol para o cultivo neste trabalho, o regime de operação de batelada sequencial, aproveitando o melhor de cada cepa, parece promissor.

CONCLUSÕES

Por meio do estudo em batelada, foi possível determinar as cinéticas de consumo de substrato e produção de etanol por diferentes micro-organismos, primeiramente com ensaios padrões utilizando glicose como fonte de carbono e empregando *S. cerevisiae*, *Z. mobilis*, *P. stipitis* e *P. tannophilus*, seguida da realização de ensaios com caldo hidrolisado de pseudocaule não-concentrado e concentrado empregando *S. cerevisiae* e *P. tannophilus*. Com os resultados dos ensaios padrões pode-se concluir que todos são capazes de degradar ≈ 100 g/L de glicose em 24 h e produzir ≈ 40 g/L de etanol, exceto *P. stipitis*, o qual degradou pouca glicose em 48h refletindo na baixa concentração de etanol. Além disso, os ensaios realizados com pseudocaule não-concentrado com os dois micro-organismos selecionados também obtiverem resultados semelhantes, e nos ensaios com pseudocaule concentrado percebeu-se uma diferença entre as cinéticas avaliadas dos mesmos, concluindo-se que *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* são capazes de fermentar o caldo hidrolisado de pseudocaule, porém com alguma interferência ainda desconhecida do caldo concentrado em relação à fermentação de *P. tannophilus*.

Nos ensaios em batelada depois de selecionada a cocultura microbiana, o emprego da mesma na fermentação de caldo de pseudocaule de bananeira previamente sacarificado, propiciou incremento na produtividade do processo batelada simples em torno de 10% em comparação ao mesmo tipo de processo empregando monocultura de cada um dos micro-organismos avaliados (*S. cerevisiae* e *P. tannophilus*).

A destoxificação do caldo sacarificado com carvão ativo 1% antes da concentração do mosto proporcionou aumento em Q_p em torno de 20% em comparação ao mesmo tipo de fermentação com caldo não destoxificado. Este comportamento corroborou os resultados apresentado por Souza et al. (2017) onde os autores demonstraram que esse tipo de destoxificação reduziu em, no mínimo, 50% dos inibidores presentes no caldo concentrado sem destoxificação.

Houve diferença significativa (Teste de Tukey para $p < 0,05$) entre os valores de rendimento e produtividade volumétrica em etanol obtidos nos ensaios de batelada repetida ao substituir-se diferentes volumes de caldo fermentado (40% e 60%) por igual volume de meio fresco (cortes). O ensaio com 60% de corte (composição do inóculo com 50% de *S. cerevisiae* e 50% de *P. tannophilus*) apresentou os melhores resultados. A produtividade média alcançada nos três ciclos (cortes)

realizados neste processo de batelada repetida ($Q_P = 0,78 \pm 0,06$ g/(L.h)) foi maior do que a observada em um ciclo do processo simples ($Q_P = 0,28 \pm 0,01$ g/(L.h)), com mesmo tipo de substrato e mesma cocultura microbiana, essa alternativa torna-se bastante atraente pois além da maior produtividade ainda pode contribuir para a redução dos “tempos mortos” normalmente presentes em maior número na batelada simples. Conseqüentemente, a produtividade global considerando longos períodos de produção pode aumentar proporcionalmente mais no processo de batelada repetida do que a batelada simples.

Para os processos de batelada sequencial, um aumento da concentração inicial de inóculo (de 3,0 g/L para 17 g/L) aumentou a produtividade do processo em 16%. Comparando o processo de batelada sequencial com o processo batelada simples com as mesmas condições e mesma concentração inicial de inóculo, ocorreu um aumento de aproximadamente 185% na produtividade média indicando superioridade do processo de batelada sequencial com cultivo isolado de cada um dos micro-organismos (bioconversores de hexoses e bioconversores de pentoses) frente à batelada com cocultura.

Frente aos processos e condições avaliados, o sistema de cultivo dos micro-organismos separadamente em batelada sequencial foi o que apresentou a maior concentração em etanol no final do processo (80 g/L) e também o maior valor de produtividade (0,93 g/L.h), sendo indicado para produção de etanol 2G a partir de caldo sacarificado de pseudocaule de bananeira destoxificado.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação do processo de cultivo contínuo para produção de etanol 2G a partir de caldo de pseudocaule de bananeira sacarificado;
- Caracterização e destinação final do resíduo líquido originado na etapa de prensagem do pseudocaule de bananeira;
- Caracterização e destinação final do resíduo sólido originado na etapa de filtração do caldo de pseudocaule de bananeira sacarificado.

REFERÊNCIAS

ABAVAR. Associação dos bananicultores do Vale do Robeira. **Cultura da Banana**. Disponível em: www.abavar.com.br. Acesso em: 12 de novembro de 2015.

ABRIL, A.; AROCA, G.; SABATIER, J. **Etanol a partir de biomassa lignocelulósica**. Red IVH Empleo Biomassa Azucarera como Fuente de Alimento, Energía e Derivados com la Preservación del Medio Ambiente, Habana, Cuba, 2006.

AELING, K.A.; SALMON, K.A.; LAPLAZA, J.M.; LI, L.; HEADMAN, J.R.; HUTAGALUNG, A.H.; PICATAGGIO, S. Co-fermentation of xylose and celobiose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Ind Microbiol Biotechnol** v. 39, p. 1597–1604, 2012.

AGBOGBO, J.K.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K.S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**. v. 41. p. 2333-2336, 2006.

AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipites*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1515-1524, Abr. 2008.

ALMEIDA, J.; BERTILSSON, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.; GORSICH, S.; LIDÉN, G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 625-638, 2009.

ANEEL. AGENCIA NACIONAL DE ENERGIA ELETRICA. **Biomassa**. Atlas de Energia Elétrica do Brasil. 2008. Disponível em: http://www.aneel.gov.br/arquivos/pdf/atlas_par2_cap4.pdf. Acesso em: 21 de novembro de 2014.

ANP. AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. **Biocombustíveis**. Disponível em <http://www.anp.gov.br/?id=470>. Acesso em: 20 de setembro de 2014.

ANP. AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. **Produção de Biocombustíveis**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/producao-de-biocombustiveis> Acesso em: 02 de fevereiro de 2017.

ARIN, G.; DEMIRBAS, A. Mathematical modeling the relations of pyrolytic products from lignocellulosic materials. **Energy Sources**. v. 26. p. 1023-1032, 2004.

ASHOOR, S.; COMOTINI, F.; CIANI, M. Cell-recycle batch process of *Scheffersomyces stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae* co-culture for second generation bioethanol production. **Biotechnology Letters**. v. 37. p. 2213-2218, 2015.

ATALA, D.I.P.; FILHO, F.M. **Processo fermentativo extrativo à vácuo para a produção de etanol, C12P 7/14, C12R 1/865**. Brazil, PI 0500321-0, 2006.

BALAT, M.; AYAR, G. Biomass Energy in the World: Use of Biomass and Potential Trends. **Energy Sources**. v. 27. p. 931-940, 2005.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol process. **Progress in energy and combustion Science**. v. 12. p. 2-19, 2007.

BALAT, M. & BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. **Applied Energy**. v. 86, p. 2273-2282. 2008.

BALLESTEROUS, M.; OLIVIA, J.M.; MANZANARES, P.; NEGRO, M.J.; BALLESTEROUS, I. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. **World Journal Microbiology and Biotechnology**. v. 18. p. 559-561, 2002.

BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BASTOS, V.D. Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. **Banco Nacional de Desenvolvimento Setorial**, Rio de Janeiro, n.25, p.5-38, Mar. 2007.

BELAL, E.B. Bioethanol production from rice straw residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, 225-234, 2013.

BERNDES, G.; HOOGWIK, M.; VAN DEN BROEK, R. The contribution of biomass in the future global energy supply: a review of 17 studies. **Biomass and Bioenergy**. v. 25. p. 1-28, 2003.

BINDER, A.; PELLONI, L.; FIECHTER, A. Delignification of straw with ozone to enhance biodegradability. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 11. p. 1-5, 1980.

BORZANI, W.; PODLECH, P. A. S.; JERKE, P. R.; SOUZA NETO, C.; PASSOS, R. F.; SOUZA, O. Batelada repetidas Lactica Fermentation of Whey by *Lactobacillus bulgaricus*. Experimental Results. **Biotechnology Letters**, Inglaterra, v. 12, n.7, p. 531-534, 1990.

BOTHAST, R.J.; NICHOLS, N.N.; DIEN, B.S. Fermentations with new recombinant organisms. **Biotechnology Progress**. v. 15. p. 867-875, 1999.

BP. **Statistical review of world energy**. Disponível em: www.bp.com. Acesso em: 12 de novembro de 2015

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4862-4874, 2010.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, W.D.; SOUZA, A.P. **As rotas para o etanol celulósico no Brasil**. Departamento de Botânica – IBUSP. Cidade Universitária. Butantã – São Paulo, 2013.

CARA, C., RUIZ, E., OLIVA, J.M., SÁEZ, F., CASTRO, E., Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification . **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1869-1876, 2008.

CARDENAS, M. Methanol and Hydrogen Production. **Energy and Costs Analysis**. v. 34, 2006.

CAVKA, A. e JÖNSSON, L.J. Detoxofocation os lignocelulosic hydrolyzates using sodium brohydride. **Bioresource Technology**. v. 136. p. 368-376, 2013.

CEPA - **Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola**. Disponível em: http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepapublicacoes/Sintese_2016.pdf. Acesso em: 15 de fevereiro de 2016.

CHANDEL, A.K.; CHAN, E.; RUDRAVARAM, R.; NARASU, M.I.; RAO, L.V.; RAVINDRA, P. Economics and environmental impact of bioetanol production Technologies: an appraisal. **Biotechnology Molecular and Biological**. v. 2. P. 14-32, 2007.

CHANG, Y.; CHANG, K.; HUANG, C.; HSU, C.; JANG, H. Comparison of batch and fed-batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production. **Fuel**. v. 97. p. 166-173, 2012.

CLAASSEN, P.A.M.; LOPEZ CONTRERAS, A.M.; SIJTISMA, L.; WEUSTHUIS, R.A.; VAN LIER, J.B.; VAN NIEL, E.W.J.; STAMS, A.J.M.; DE VRIES, S.S. Utilisation of biomass for the supply of energy carries. **Applied Microbiology and Biotecnology**. v. 52. p. 741-755, 1999.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMINGUES, J. M.; SILVA, S. S. Effect of temperature on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 339–345, 2001.

CORDEIRO, N.; BELGACEM, M.N.; TORRES, I.C.; MOURA, J.C.V.P. Chemical composition and pulping of banana pseudo-stems. **Industrial Crops and Products**. v.19, p. 147-154, 2004.

CORTEZ, L.A.B.; JORDAN, R.A.; PÉREZ, J.M.M.; ROCHA, J.D. *Roadmap* tecnológico para o etanol. In: Cortez, L.A.B. (Org), **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**, São Paulo, Ed. Blucher, p.919-935, 2008.

CTBE – **Centro de Ciência e Tecnologia do Bioetanol**. Disponível em: www.bioetanol.org.br. Acesso em: 18 de setembro de 2015.

COSTA, S. S., SANTOS, A. M., SILVA, C. F., & de SOUZA, R. R. Estudo do processo de sacarificação da crueira visando a produção de bioetanol. **Scientia Plena**, v. 12, n. 8, 2016.

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

DAS, A.; PAUL, T.; JANA, A.; HALDER, S. K.; GOSH, K.; MAITY, C.; MOHAPATRA, K. P. D.; PATI, B. R.; MONDAL K. C. Bioconversion of rice straw to sugar using multizyme complex of fungal origin and subsequent production of bioethanol by mixed fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 173 and *Zymomonas mobilis* MTCC 2428. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 217-225, 2013.

DAS, S.; BHATTACHARYA A.; HALDAR, S.; GANGULY, A.; GU S.; TING, Y.P.; CHATTERJEE, P.K. Optimization of enzymatic saccharification of water hyacinth biomass for bio-ethanol: Comparison between artificial neural network and response surface methodology. **Sustainable Materials and Technologies**, Vol. 3, p. 17–28, 2015.

DE BARI, I.; CUNA, D.; NANNA, F.; BRACCIO, G. Ethanol production in immobilized-cell bioreactors from mixed sugars syrups and enzymatic hydrolysates of steam-exploded biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 114. p. 539-557, 2004.

DEMIRBAS, A. Estimating of structural composition of wood and non-wood biomass samples. **Energy Sources**. v. 27. p. 761-767, 2005.

DEVARAPALLI, M.; ATIYEH, H.K.; PHILLIPS, J.R.; LEWIS, R.S.; HUHNKE, R.L. Ethanol production during semi-continuous syngas fermentation in a trickle bed reactor using *Clostridium ragsdalei*. **Bioresource Technology**. v. 209. p. 56-65, 2016.

DAHNUM, D.; TASUM, S. O.; TRIWAHYUNI, E.; NURDIN, M.; ABYMANIU, H., Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. **Energy Procedia**, v. 68, p. 107–116, 2015.

DISHISHA, T.; IBRAHIM, M.H.A.; CAVERO, V.H.; ALVAREZ, M.T.; HATTI-KAUL, R. Improved propionic acid production from glycerol: Combining cyclic batch and sequential batch fermentations with optimal nutrient composition. **Bioresource Technology**. v. 176. p. 80-87, 2015.

DOMINGUES, L.; VICENTE, A.A.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A. Applications of yeast flocculation in biotechnological process. **Biotechnology Bioprocess**. v. 5. p. 288-305, 2000.

EL-DALATONY, M.M.; KURADE, M.B.; ABOU-SHANAB, R.A.I.; KIM, H.; SALAMA, E.; JEON, B. Long-term production of bioethanol in repeated batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**. v. 219. p. 98-105, 2016.

EPE - Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional**. Disponível em:

www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/BEN/2_-_BEN__Ano_Base/1_-_BEN_Portugues_-_Inglxs_-_Completo.pdf. Acesso em: 20 de novembro de 2014.

ERNANDES, F.M.P.G. e GARCIA-CRUZ, C.H. Zymomonas mobilis: a promising microorganism for alcoholic fermentation. **Ciências de Alimentos**. v. 30. nº. 2. p. 361-380, 2009.

ETHANOL STATISTICS. **Cellulosic Ethanol 1008-2020**. v.1. nº 1. p. 23, 2008. Disponível em: www.ethanolstatistics.com.

EXXON MOBIL. **A report in energy trends greenhouse gas emissions and alternative energy**. Disponível em: www.esd.lbl.gov. Acesso em 13 de setembro de 2015.

FAN, C.; QI, K.; XIA, X.; ZHONG, J. Efficient ethanol production from corncob residues by repeated fermentation of an adapted yeast. **Bioresource Technology**. v. 136. p. 309-315, 2013.

FAO - **ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/E>. Acesso em: 06 de agosto de 2015.

FERIOTTI, D.G. **Proposta de Aproveitamento do Pseudocaule da Bananeira (*Musa Cavendish*)**. 2010. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Engenharia de Mauá. São Caetano do Sul, 2010.

FERREIRA, J. **Produção de Levana e Bioetanol utilizando Cascas de Banana por *Zymomonas mobilis***. 2013. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2013.

FINGUERUT, J.; MEIRELLES, A.J.; GUIRARDELLO, R.; COSTA, A.C. Fermentação, Hidrólise e Destilação. In: Cortez, E.E.S.; Lora, E.E.S.; Gomes, E.O. (Org), **Biomassa para Energia**, Campinas: Ed. UNICAMP, p.435-491, 2008.

FRIEDICH, F.J. La energia de la biomassa. **S.A.P.T. Publicaciones Técnicas**, S.L., 2ª ed., 135 p., 1999.

FU, N. e PEIRIS, P. Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnonology**. v. 24. p. 1091-1097, 2008.

FURLAN, V.J.M. **Produção de bioetanol a partir de resíduos celulósicos da Agroindústria do Arroz**. 2009. Dissertação (Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 59. p. 618-628, 2002.

GAMAGE, J.; HOWARD, L.; ZISHENG, Z. Bioethanol production from lignocellulosic biomass. **Biobased Mater Bioenergy**. v. 4. p. 3-11, 2010.

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

GOLDEMBERG, J. A estratégia de São Paulo para o etanol. In: Cortez, L. A. B. (Org), **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**, São Paulo, Ed: Blucher, 2010, p.19-25.

GONÇALVES FILHO, L. **Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica: avaliação de diferentes processos de despolimerização**. 84p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2011.

GONÇALVES FILHO, L.C.; FISCHER, G.A.A.; SELLIN, N.; MARANGONI, C.; SOUZA, O. Hydrolysis of banana tree pseudostem and second-generation ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Environmental Science and Engineering**, v. 2, n. 1A, p. 65-69, 2013.

GROOTJEN, D.R.J.; MEIJLINK, L.H.H.M.; VLEESNBEEK, R.; VAN DER LANS, R.G.J.M.; LUYBEN, A.M. Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* in combination with *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbiology and Technology**. v. 13. p. 530-536, 1991.

GUEDES, F.F. **Inovação na produção de etanol de segunda geração pela sacarificação de resíduos de algodão provenientes da indústria têxtil**. 2012. Dissertação (Pós-Graduação em Química). Universidade Regional de Blumenau. Blumenau, 2012.

GUIMARÃES, J.L. Characterization of banana, sugarcane bagasse and spong gourd fibers of Brazil. **Industrial Crops Products**, 2009.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSKUNG, M.F.; G. ZACCHI, G.L. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, 2007.

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

HARMSSEN, P.F.H., HUIJGEN, W.J.J., BERMÚDEZ LÓPEZ, L.M., BAKKER, R.R.C. Literature Review of Physical and Chemical

Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. **BioSynergy Project**, 2010.

HEBLING, R.M.U. **Efeitos de aditivos sobre a fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis***. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 1995.

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

HICKER, L. R. et al. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 508-514, 2013.

HICKERT, L.R.; SOUZA-CRUZ, P.B.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. **Bioresource Technology**, v. 143. p. 112-116, 2013.

HIROCE, R. **O aproveitamento do pseudocaule**. O Estado de São Paulo, 19 mar. 1972. Suplemento Agrícola 877.

HOOGWIK, M.; FAAIJ, A.; VAN DEN BROEK, R.; BERNDES, G.; GIELEN, D.; TURKENBURG, W. Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. **Biomass and Bioenergy**, v. 25. p. 119-133, 2003.

HOPFNER, S.A. **Produção de etanol por diferentes espécies de micro-organismos a partir de mostos de cascas de banana (frescas ou sacarificadas) com diferentes concentrações de açúcares redutores**. 2015. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Processos). Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2015.

HSU, T-C.; GUO, G-L.; CHEN, W-H.; HWANG, W-S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, p.4907–4913, 2010.

INGALE, S., JOSHI, S. J., GUPTA, A. **Production of bioethanol using agricultural waste: banana pseudo stem.** Braz. J. Microbiol. v.45 n.3, São Paulo, 2014.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY – IEA. **Biofuels for Transport – An international perspective, 2006.** Disponível em: www.iea.org. Acesso em 15 de janeiro de 2016.

ITAL. **Banana: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos.** Série frutas tropicais. 2. Ed. Campinas, SP: ITAL. v. 3. p. 302, 1985.

JARDIM, W. R.; GOUVÊA, A. de F. G. Aplicação do conceito de biorefinaria na utilização do bambu visando à produção de etanol. **ANAIS DO ENIC**, n. 6, 2015.

JARMAN, C.G.; MYKOLUK, S.; KENNEDY, L.; CANNING, A.J. Banana fibre: a review of its properties and small-scale extraction and processing. **Tropical Science**, London, v.19, n.4, p. 173-185, 1997.

JOHANSSON, T.; KELLY, H.; REDD, Y.; WILLIA. MS, R. **Renewable Energy: Source for Fuels and Electricity.** California: Island Press, p. 865-885, 1993.

JONSSON, L. J., ALRIKSSON, B., NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels.** 2013. 6:16.

JORGENSEN, H.; VIBE-PEDERSEN, J.; LARSEN, J.; FELLBY, C. Liquefaction of lignocelluloses at high-solids concentrations. **Biotechnology Bioengineering.** v. 96. p. 862-870, 2007.

JUST, L.P.; LIEBL, G.; MONTAGNOLI, M.S.; MARANGONI, C.; SELLIN, N.; SOUZA, O. **Produção de bioetanol de pseudocaule de bananeira por diferentes espécies de micro-organismos.** Anais. IV Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais. Rio de Janeiro, 2015.

KARAGÖZ, P. e ÖZKAN, M. Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture in

batch and continuous system. **Bioresource Technology**. v. 158. p. 286-293, 2014.

KARHUMAA, K.; SANCHEZ, R.G.; HAHN-HÄRGENDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Comparison of the xylose reductase-xylytol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**. v. 6, 2007.

KARIMI, M.; JENKINS, B.; STROEVE, P. Ultrasound irradiation in the production of ethanol from biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Vol. 40, p. 400–421, 2014

KIM, S.; HOLTZAPFLE, M.T. **Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover**. v. 97. p. 583-591, 2006.

KIM, S.R.; LEE, K.; CHOI, J.; HA, S.; KWEON, D.; SEO, J.; JIN, Y. Repeated-batch fermentations of xylose and glucose mixtures using a respiration-deficient *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism. **Journal of Biotechnology**. v. 150. p. 404-407, 2010.

KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B.; AHRING, B.K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 66. p. 10-26, 2004.

KIIPPER, P.G. **Estudo da pré-hidrolise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus***. 2009 Dissertação (Microbiologia aplicada). Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2009.

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

KRISHNAN, M.S.; NGHIEM, N.P.; DAVISON, B.H. Ethanol production from corn starch in a fluidized-bed bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 78. p. 459-372, 1999.

KUHAD, R. C. et al. Bioethanol production from pentose sugar: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 12, p. 4950-4962, 2011.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL. **Biociencia Industrial**. Volume III. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001.

LIMA, T., ARAÚJO, I., ANTUNES, J., MATOS, C. J., & PEREIRA, C. Estudo da produção de bioetanol a partir do bagaço de malte. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 595-600, 2014.

LI, Y.L.; PARK, J.; SHIROMA, R.; TOKUYASU, K. Bioethanol production from rice straw by a sequential use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* with heat inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* cells prior to xylose fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 111. p. 682-686, 2011.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 69. p. 627-642, 2006.

LIN, C.; WU, C.; TRAN, D.; SHIH, M.; LI, W.; WU, C. Mixed culture fermentation from lignocellulosic materials using thermophilic lignocellulose-degrading anaerobes. **Process Biochemistry**. v. 46, p. 489-493, 2011.

LYND, L.R, VAN ZYL, W.H., MCBRIDE, J.E., LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p. 577-583, 2005.

LORA, E.E.S.; VENTURINI, O.J. **Biocombustíveis**. v. 1. 1200 p. Rio de Janeiro: Interciência, 2012.

LU, X. B.; ZHANG, Y. M.; YANG, J.; LIANG, Y. Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. **Chemical Engineering & Technology**, v. 30, n. 7, p. 938-944, 2007.

MACEDO, H. **III Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para produção de etanol**. Projeto Programa de Pesquisas em Política Públicas, 2008.

MACEDO, I.M. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos Avançados**, v. 21 n. 59, 2007.

MAITI, B.; RATHORE, A.; SRIVASTAVA, S.; SHEKHAWAT, M.; SRIVASTAVA, P. Optimization of process parameters for ethanol production from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology and genetic algorithm. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-11, 2011.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DA PECUÁRIA. Disponível em:

http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/estatisticas/producao/atualizacao_20_01_2011/Producao_Etanol_Brasil_Total.pdf. Acesso em: 30 de novembro de 2015.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Acompanhamento da Produção Sucroalcooleira. Levantamento da Safra 2016. Disponível em: <

http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/estatisticas/acompanhamento%20producao%20sucroalcooleira/CRONOLOGIA.pdf>. Acesso em 02 fev. 2017.

MATEO, S.; ROBERTO, I.C.; SANCHEZ, S.; MOYA, A.J. Detoxification of hemicelulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. **Industrial Crops and Products**. v. 49. p. 196-203, 2013.

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

MEDINA, J.C. **Plantas fibrosas da flora mundial**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas. p. 913, 1959.

MENDONÇA, J.C.M.; ANDRADE, L.A.; RIBEIRO, E.J.; CARDOSO, V.L. **Contribuição ao estudo da fermentação alcoólica em altas concentrações iniciais de sacarose**. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Uberlândia/MG – julho, 2009.

MENON, V.; RAO, M. **Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept**. v. 38. p. 522-550, 2012.

MICHEL, A.C.S. **Produção Biotecnológica de Xilitol e Etanol a partir de hidrolisado de casca de soja**. Dissertação (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MIKULÁŠOVÁ, M.; VODNÝ, Š.; PEKAROVIČOVÁ, A. Influence of phenolics on biomass production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. **Biomass**, v. 23, n. 2, p. 149-154, 1990.

MILLER, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, 1959.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Biomassa**. Disponível em:
<http://www.mma.gov.br/clima/energia/energias-renovaveis/biomassa>.
Acesso em: 21 de novembro de 2014.

MINMUNIM, J., LIMPITIPANICH, P., PROMWUNGKWA, A. Delignification of elephant grass for production of cellulosic intermediate. **Energy Procedia**. v. 79. p. 220-225, 2015.

MIRANDA JÚNIOR, M.; BATISTOTE, M.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. **J. Inst. Brew**, v. 115, n. 3, p. 191-197, 2009.

MORAIS, J.O.F.; RIOS, E.M.M.M.; CALAZANS, G.M.T.; LOPES, C.E. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. **Journal of Biotechnology**. v. 31. p. 75-91, 1993.

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

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

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

NISHIWAKI, A.; DUNN, I.J. Operating conditions for high production rates of ethanol in a continuous two-stage fermenter with cell recycle. **Canada Journal of Chemistry and Engineering**. v. 83. p. 904-908, 2005.

NUNES, R.M.; GUARDA, E.A.; SERRA, J.C.V.; MARTINS, A.A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p.113-238, 2013.

OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V.; NANJUNDASWAMY, A.; BANSAL, S.; SINGH, S.; KAUR, S.; BABBAR, N. Enhanced ethanol production from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) waste via a statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process. **Bioresource Technology**. v. 103. p. 1593-1601, 2011.

OCHOA, S.; WOZNY, G.; REPKE, J. Plantwide optimizing control of a continuous bioethanol production process. **Journal of Process Control**. v. 20. p. 983-998, 2010.

OLIVEIRA, L., COREDIRO N., EVTUGNIN, E.V., TORRES, I.C., SILVESTRE A.J.D., Chemical composition of different morphological parts from “Dwarf Cavendish” banana plant and their potential as a non-wood renewable source of natural products. **Industrial Crops and Products**, v.26, p. 163-172, 2007.

OLIVEIRA, F. P. **Avaliação da aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares**. Dissertação de Mestrado em Ciências, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 140 p, 2013.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312-331, 2006.

OUN, A., RHIN, J. Isolation of cellulose nanocrystals from grain straws and their use for the preparation of carboxymethyl cellulose-based

nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers** v.150, p.187–200, 2016.

PALACIO, J.C.E.; LORA, E.E.S.; VENTURINI, O.J.; OLMO, O.A. Biocombustíveis, meio ambiente, tecnologia e segurança alimentar. In: Lora, E.E.S.; Venturini, O.J. (Org), **Biocombustíveis**, Rio de Janeiro, Ed: Interciência., 2012. p. 2-42.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: Inhibitors and Mechanisms of Inhibition. **Bioresource Technology**. v. 74. nº 1. p. 25-33, 2000.

PATLE, S.; LAL, B. Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**. v. 32, p. 596-602, 2008.

PERDICES, M.B.; ARCAAYA, G.E.A.; COTAL, D.S.O.; MENDOZA, M.A.G.; NUNES, D.C.L. Bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos pela rota da hidrólise. In: LORA, E.E.S.; VENTURINI, O.J. **Biocombustíveis**, Rio de Janeiro, Ed.: Interciência. p. 535-585, 2012.

PEREIRA, F.; GOMES, D.; GUIMARÃES, P.; TEIXEIRA, J.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 1, p. 45-53, 2012.

PEREIRA, M. B.; MENDES, TPP; SELATTO, A. A. Produção de bioetanol a partir de resíduos da indústria do suco. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 651-656, 2014.

PEREIRA, V. M., de OLIVEIRA RIBEIRO, L., TRANCOSO, H., ANTUNES, J. G., MENDES, M. F., & PEREIRA, C. D. S. S. Produção de bioetanol a partir de coproduto gerado no descarocamento de azeitona. **Revista Eletrônica TECEN**, v. 6, n. 1/2, 2016.

PHUKOETPHIM, N.; SALAKKAN, A.; LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L. Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under batch and fed-batch fermentations: Effects of

sugars levels, nitrogen supplementation and feeding regimes. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2017.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 403 f. Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2010.

RAMOS, L. P., Pitarelo, A. P., Silva, T. A., Efeito do ácido fosfórico sobre o pré-tratamento a vapor do bagaço de cana-de-açúcar e sua susceptibilidade à hidrólise enzimática. In: **Congreso Iberoamericano de Investigacion en Celulosa y Papel**, 2008, Guadalajara.

REDDING, A.P.; WANG, Z.; KESHWANI, D.R.; CHENG, J.J. High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 102, 1415–1424, 2011.

REIJNDERS, L. Conditions for the sustainability of biomass based fuel use. **Energy Policy**, v. 34. p. 863-876, 2006.

REGINATTO, V., ANTONIO, R.V. Fermentative hydrogen production from agroindustrial lignocellulosic substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 46. n 2. São Paulo, 2015.

RIEGER, M.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. The role of limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**. v. 129. p. 653-661, 1983.

RIVERA, E.C.; ATALA, D.I.P.; FILHO, F.M.; COSTA, A.C.; FILHO, R.M. Development of real-time state estimators for reaction-separation process: A continuous flash fermentation as a study case. **Chemical Engineering and Process: Process Intensification**. v. 49. p. 402-409, 2010.

RODRIGUES, J.A. Do engenho à biorefinaria: a usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**. v. 34. nº 7. p. 1242-1254, 2011.

RODRIGUES, T. H. S., Estudo comparativo da produção de etanol por processos de SHF (Fermentação e Hidrólise Separadas) e SSF (Fermentação e Hidrólise Simultâneas) de bagaço de caju (*Anacardium occidentale* L.). Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.2014.

ROGERS, P.L.; JEON, Y.J.; LEE, K.J.; LAWFORD, H.G. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. p. 253-288, 2007.

ROMERO-ANAYA, A. J., MOLINA, A., GARCIA, P., RUIZ-COLORADO, A. A., SOLANO, A. L., LECEA, C. S. M. Phosphoric acid activation of recalcitrant biomass originated in ethanol production from banana plants. **Biomass and Bioenergy**. v. 35, n 3, p. 1196-1204, 2011.

SADLLER, J., KUMAR, L. Special Issue from the NSERC Bioconversion network workshop: pretreatment and fractionation of biomass for biorefinery/biofuels. **Biotechnology for Biofuels**. v. 6, n. 17, 2013.

SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU, Y.V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3693–3700, 2005.

SÁNCHEZ, Ó.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**. v. 99. p. 5270-5295, 2008.

SANDA, T.; HASUNUMA, T.; MATSUDA, F.; KONDO, A. Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 7917-7924, 2011.

SANTOS, D.S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. 2012. Tese (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SANTOS, F. A., QUEIROZ, J. H., COLODETTE, J. L., MANFREDI, M., QUEIROZ, M. E. L. R., CALDAS, C. S., SOARES, F. E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Quím. Nova** v.37 n.1 São Paulo, 2014.

SANTOS, S.C.; SOUSA, A.S.; DIONISIC, S.R.; TRAMONTINA, R.; RULLER, R.; SQUINA, F.M.; ROSSEL, C.E.V.; COSTA, A.C.; IENCZAK, J.L. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. **Bioresource Technology**. v. 219. p. 319-329, 2016.

SASSNER, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**. v. 32. p 422-430, 2008.

SATHESH-PRABU, C.; MURUGESAN, A.G. Potencial utilization of sorghum field waste for fuel ethanol production employing *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**. v. 102. p. 2788-2792, 2011.

SATYANARAYANA, K.G.; GUIMARÃES, J.L.; WYPYCH, F. **Studies on lignocellulosic fibers of Brazil**. Part I: Source, production, morphology and applications. Composites Part A. v. 38. p. 1694-1709, 2007.

SCHULZ, M.A. **Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: Polpa e Cascas de Banana**. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de processos) – Universidade da região de Joinville, Joinville, 2010.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biocnologia Industrial**. São Paulo, Ed: Edgard Blücher Ltda, vol.2, 2001.

SEABRA, J. E. A. **Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil**. 274 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SEO, H.B.; KIM, S.; LEE, H.Y.; JUNG, K.H. Improved bioethanol production using activated carbon-treated acid hydrolysate from corn hull in *Pachysolen tannophilus*. **Mycobiology**, v. 37, p. 133-140, 2009.

SILVA, N.L.C.; BETANCUR, G.J.V.; PEREIRA JR., N. **Produção de bioetanol a partir de cavaco residual da indústria de celulose: otimização do pré-tratamento ácido de fermentação do hidrolisado hemicelulósico**. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal/RN, ago, 2009.

SINGH, L. K.; MAJUMDER, C. B.; GHOSH, S. Development of sequential-co-culture system (*Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis*) for bioethanol production from Kans grass biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 150-157, 2014.

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

SLININGER, P. J.; THOMPSON, S. R.; WEBER, S.; LIU, Z. L.; MOON, J. Repression of xylose-specific enzymes by ethanol in *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis* and utility of repitching xylose-grown populations to eliminate diauxic lag. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 8, p. 1801-1815, 2011.

SILVA, L.A.O. **Utilização do pseudocaule da bananeira para produção de celulose e papel**. 1998. 90p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

SIMS, R.E.H.; SCHOCK, R.N.ADEGBULULGBE, A.; FENHANN, J.; KONSTANTINAVICIUTE, I.; MOOMAW, W.; NIMIR, H.B.; SCHLAMADINGER, B.; TORRES-MARTÍNEZ, J.; TURNER, C.; UCHIYAMA, Y.; VUORI, S.J.V.; WAMUKONYA, N. ZHANG, X. Energy Suply. *In*: Climate Change, 2007: Mitigation. **Contribution of working group III to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change**. METZ, B.; DAVIDSON, O.R.; BOSCH, P.R.; DAVE, R.; MEYER, L.A. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido e Nova York, EUA, 2007.

SMEETS, E.M.W.; FAAIJ, A.P.C.; LAWANDOWSKI, I.M.; TURKENBURG, W.C. A bottom-up assessment and review of global

bio-energy potentials to 2050. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 33. p. 56-106, 2007.

SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. Conversão da Celulose pela tecnologia Organosolv. **NAIPPE/USP**, v. 3, p. 5-29, 2007.

SOFFNER, M.L.A.P. **Produção de polpa celulósica a partir de engaço de bananeira**, 2001. 56 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, 2001.

SOLTANI, N., BAHRANI, A., PECH-CANUL, M. I., GONZALEZ, L. A. Review on the physicochemical treatments of rice husk for production of advanced materials. **Chemical Engineering Journal** v. 264, p. 899-935, 2015.

SOONTORNCHAIBOON, W.; CHUNHACHART, O.; PAWONGRAT, R. Ethanol production from yam bean using yeast *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339. 1st Mae Fah Luang University International Conference 2012.

SOUZA, E.L. **Influência do pré-tratamento e da concentração de biomassa sobre a sacarificação de pseudocaule de bananeira e avaliação da destoxificação do caldo hidrolisado sobre a produção de etanol**, 2015. 117f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville, Univille, Joinville, 2015.

SOUZA, O.; FEDERIZZI, M.; COELHO, B.; WAGNER, T.M.; WISBECK, E. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos gerados na bananicultura e sua valorização para a produção de biogás. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 4, p. 438-443, 2010.

SOUZA, O.; SCHULZ, M.A.; FISCHER, G.A.A.; WAGNER, M.T.; SELLIN, N. Energia alternative de biomassa: bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 8, p. 915-921, 2012.

SOUZA, O.; MONTAGNOLI, M.S.; SCHULZ, M.A.; SOUZA, E.L.; SELLIN, N.; MARANGONI, C.. **Bioetanol de cascas da fruta e**

pseudocaule da bananeira. XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos. Foz do Iguaçu, PR, 2013.

SOUZA, E.L.; LIEBL, G.F.; MARANGONI, C.; SELLIN, N.; MONTAGNOLI, M.S.; SOUZA, O. Bioethanol from fresh and dried banana plant pseudostem. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 271-276, 2014a.

SOUZA, P.K., SOUZA, O., SELLIN, N., MARANGONI, C. **Influence of Dry Mass Content Pseudostem in Conversion of Cellulose to Glucose for Biotethanol Production.** 12th International Chemical and Biological Engineering Conference – ChemPor 2014, Book of Extended Abstracts n° 13, p. 22-24, 2014b.

SOUZA, E.L.; SELLIN, N.; MARANGONI, C.; SOUZA, O. The influence of different strategies for the saccharification of the banana plant pseudostem and the detoxification of concentrated broth on bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2017.

STAMBUK, B.U.; ELEUTHERIO, E.C.A.; PARDO-FLOREZ, L.M.; MAIOR, A.M.S.; BON, E.P.S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 918-926, 2008.

STELTE, W. Steam explosion for biomass pre-treatment. **Danish Technological Institute**, 2013.

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

SURIYACHAI, N.; WEERASAIA, K.; LAOSIRIPOJANA, N.; CHAMPREDA, V., UNREAN, P. Optimized simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture using design of experiments. **Bioresource Technology**, Vol.142, p. 171–178, 2013.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TALEBNIA, F.; TAHERZADEH, M.J. In situ detoxification and continuous cultivation of dilute-acid hydrolyzate to ethanol by encapsulated *S. cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**. v. 125. p. 377-384, 2006.

TANO, M.S. e BUZATO, J.B. Effect of the presence of initial ethanol on ethanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 34. p. 242-244, 2003.

TANTIPAIBULVUT, S.; PINISAKUL, A.; RATTANACHAISIT, P.; KLATIN, K.; ONSRIPRAI, B.; BOONYARATSIRI, K. Ethanol production from desizing wastewater using co-culture of *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Energy Procedia**. v. 79. p. 1001-1007, 2015.

TESKE, S.; SCHÄFER, O. Energy revolution: a sustainable world energy outlook. **Renewable Energy World**, 2007. Disponível em: www.mme.gov.br. Acesso em 13 de setembro de 2015.

TOMAS-PEJO, E.; OLIVIA, J.M.; BALLESTEROS, M. Realistic approach for full scale bioethanol production from lignocellulose: a review. **Journal of Scientific & Industrial Research**. v. 67. p. 874-884, 2008.

TORRES, F.M.; VALLE, L.A.F.; FILHO, R.P.D. **Petrobrás: uma empresa de energia e o programa brasileiro de biocombustíveis**. Universidade Petrobrás. Escola de Ciências e Tecnologias de Gás e Energia, Rio de Janeiro, Brasil. 5º Congresso Internacional de Bioenergia – 10 a 13/08/2010. Curitiba – PR.

TOSETTO, G. M. **Comportamento de linhagens industriais de Saccharomyces frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol**. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 255 p, 2008.

TRAN, D.T.; YET-POLE, I; LIN, C.W. Developing co-culture system of dominant cellulolytic *Bacillus* sp. THLA0409 and dominant ethanolic *Klebsiellaoxytoca* THLC0409 for enhancing ethanol production from lignocellulosic materials. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 2013.

ÚNICA - **União da Indústria de Cana-de-Açúcar, na rota do etanol de segunda geração.** Disponível em: www.unica.com.br/opiniao/show.asp?msgCode=%7BFED59F0E-CB38-4D61-B0A5-D6A9C7B2C59D%7D. Acesso em: 18 de agosto de 2012.

VAN VLEET, J.H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 300-306, 2009.

VARGA, E.; KLINKE, H.B.; RECZEY, K.; THOMSEN, A.B. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. **Biotechnology Bioengineering**. v. 88. p. 567-584, 2004.

WANG, Q., WANG, Z., SHEN, F., HU, J., SUN, F., LIN, L., YANG, G., ZHANG, G., DENG, S. Pretreating lignocellulosic biomass by the concentrated phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) for enzymatic hydrolysis: Evaluating the pretreatment flexibility on feedstocks and particle sizes. **Bioresource Technology**. v. 166, p. 420-428, 2014.

WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnology**. v. 17. p. 482-487, 1999.

WILKINS, M.R.; WIDMER, W.W.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. **Process Biochemistry**. v. 42. p. 1614-1619, 2007.

WYMAN, C.E.; DALE, B.E.; ELANDER, R.T.; HOLTZAPPLLE, M.; LADISCH, M.R.; LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**. v. 96. p.1959-1966, 2005.

WYMAN, C.E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, 2007.

YADAV, K.S.; NASEERUDINN, S.; PRASHANTHI, G.S.; SATEESH, L.; RAO, V. Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**. v. 102. p. 6473-6478, 2011.

YAMAMOTO, H.; YAMAJI, K. An evaluation of bioenergy conversion technologies using a global land use and energy model. Proceedings of the **14^a European Biomass Conference**, 17 a 21 de outubro de 2005, Paris, França, p. 85-90, 2005.

YAMAOKA, C.; KURITA, O.; KUBO, T. Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures with *Kluyveromyces lactis* on high-sugar fermentation. **Microbiological Research**. v. 169. p. 907-914, 2014.

YANASE, H.; MIYAWAKI, H.; SAKURAI, M.; KAWAKAMI, A.; MATSUMOTO, M.; HAGA, K.; KOJIMA, M.; OKAMOTO, K. Ethanol production from wood hydrolysate using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 94, p. 1667-78, 2012.

YANG, B.; WYMAN, C. Pre-treatment the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuel Bioprod. Bioref.** v. 4. p. 3, 2008.

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

YOSHIDA, F.; YAMAMOTE, T.; NAKAMOTO, K. Fed-batch hydrocarbon fermentations with colloidal emulsion feed. **Biotechnology Engineering**. v. 15. p. 257-270, 2003.

YU, Z.; ZHANG, H. Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp. YZ-1 and *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**. v. 24. p. 257-258, 2003.

ZHANG, X.; ZHAO, L.; TAN, T. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. **Biomass and Bioenergy**. v. 32. P. 1156-1161, 2008.

ZHENG, Y., ZHAO, J.; XU, F.; LI, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in Energy and Combustion Science**, 2014.

APÊNDICES

Apêndice 01

Curva de calibração para a padronização do inóculo

Tabela 12: Valores de massa úmida e massa seca de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando meio de S.c. após inoculação de 48h a 30°C.

Amostra	Massa úmida (g)	Massa seca (g)	Massa celular (g/L)
A	112,8116	1,0099	10,99
B	112,6971	1,0222	10,22
C	112,7518	0,9004	9,004

Tabela 13: Dados experimentais obtidos na construção da curva de calibração da concentração celular.

Amostras	Absorbância (Abs)	Células (g)	Concentração (g/L)
1a	1,05	0,0128	1,28
1b	1,05	0,0122	1,22
2a	0,735	0,0079	0,79
2b	0,735	0,0079	0,79
3a	0,58	0,0065	0,65
3b	0,58	0,0064	0,64
4a	0,262	0,003	0,3
4b	0,262	0,0029	0,29

Figura 41: Curva de calibração da concentração celular utilizando *S. cerevisiae*, obtida das suspensões do inóculo a 600 nm.

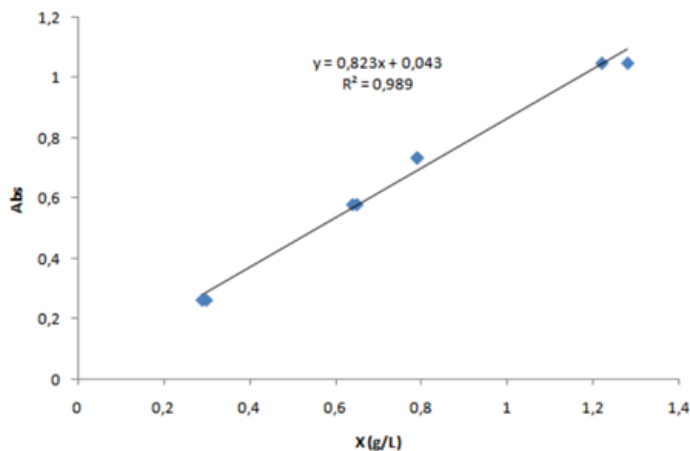
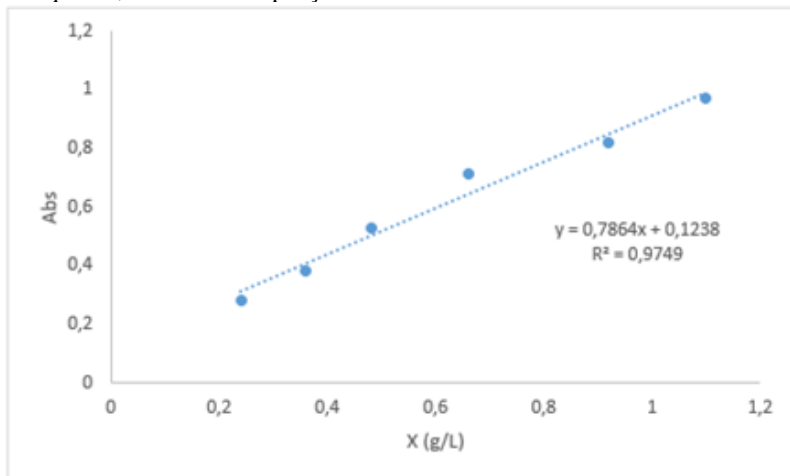


Tabela 14: Valores de absorbância de suspensões de *P. tannophilus*, utilizando meio de P.t. após inoculação de 48h a 30°C.

Diluição	Peso celular seco (g/L)	ABS
1:1	1,1	0,969
1:1,2	0,92	0,822
1:1,5	0,66	0,716
1:2	0,48	0,530
1:3	0,36	0,380
1:5	0,24	0,283
1:10	0,2	0,140

Figura 42: Curva de calibração da concentração celular utilizando *P. tannophilus*, obtida das suspensões do inóculo a 600 nm.



Apêndice 02

Curvas padrão para análises de açúcares pelo método DNS

Tabela 15: Valores de absorvância a 540 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose para a confecção da curva de calibração pelo método DNS

Concentração (g/L)	Absorbância (nm)	Teste de Equação (g/L)
0	0	0
0,1	0,041	0,09
0,25	0,139	0,24
0,5	0,296	0,49
0,75	0,456	0,74
1	0,624	1,01

Figura 43: Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose pelo método DNS.

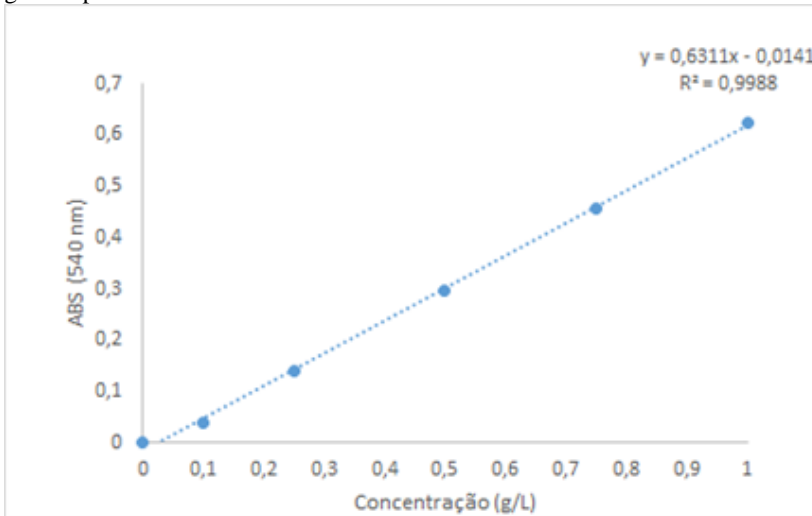


Tabela 16: Valores de absorvância a 540 nm de amostras contendo diferentes concentrações de xilose para a confecção da curva de calibração pelo método DNS.

Concentração (g/L)	Absorbância (nm)	Teste de Equação (g/L)
0	0	0
0,1	0,05	0,09
0,25	0,151	0,24
0,5	0,321	0,50
0,75	0,482	0,74
1	0,665	1,01

Figura 43: Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de xilose pelo método DNS.

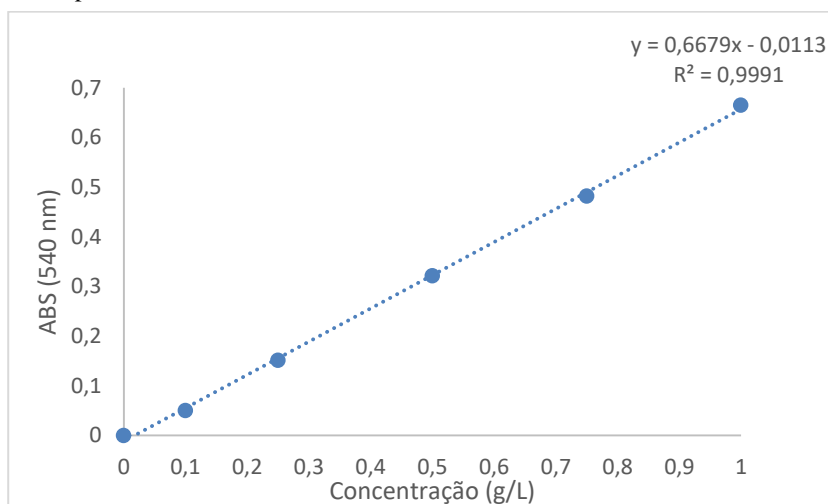
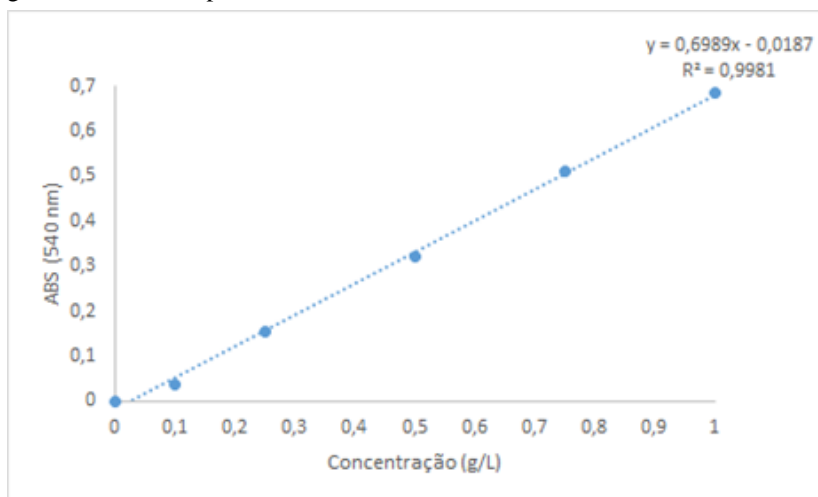


Tabela 17: Valores de absorvância a 540 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose mais xilose (50:50) para a confecção da curva de calibração pelo método DNS.

Concentração (g/L)	Absorbância (nm)	Teste de Equação (g/L)
0	0	0
0,1	0,036	0,08
0,25	0,154	0,25
0,5	0,322	0,49
0,75	0,509	0,76
1	0,684	1,01

Figura 45: Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose mais xilose pelo método DNS.



Apêndice 03

Determinação da concentração celular (gravimetria): A medida da massa seca foi realizada tomando-se uma alíquota de 10 mL de suspensão microbiana e centrifugada em centrífuga Excelsa 4 Modelo 280R a 3500 rpm (2122 g) durante 10 min. Depois de centrifugado, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em água destilada. Em seguida, a massa celular foi transferida para um conjunto de filtração dotado com membrana de nitrato de celulose da marca Sartorius (0,45 µm), previamente tarada. Procedeu-se a filtração e a membrana foi então removida do conjunto, colocada em um vidro de relógio e transferida para uma estufa com temperatura controlada de 105 °C durante 24 h. Após este tempo, a membrana foi retirada da estufa e acondicionada em um dessecador até esfriar. Após, procede-se nova pesagem. O resultado foi expresso pela equação 8 a seguir:

$$X \text{ (g/L)} = (M_2 - M_1)/V_a \quad (8)$$

Onde:

X – concentração celular (g/L)

M₁ – massa da membrana (g)

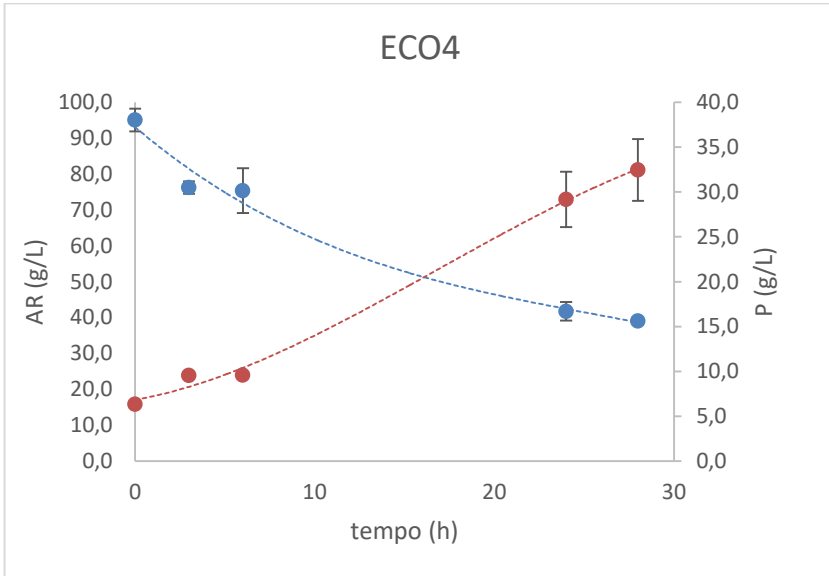
M₂ – massa da membrana + massa do material seco (g)

V_a – volume da amostra (L)

Apêndice 04

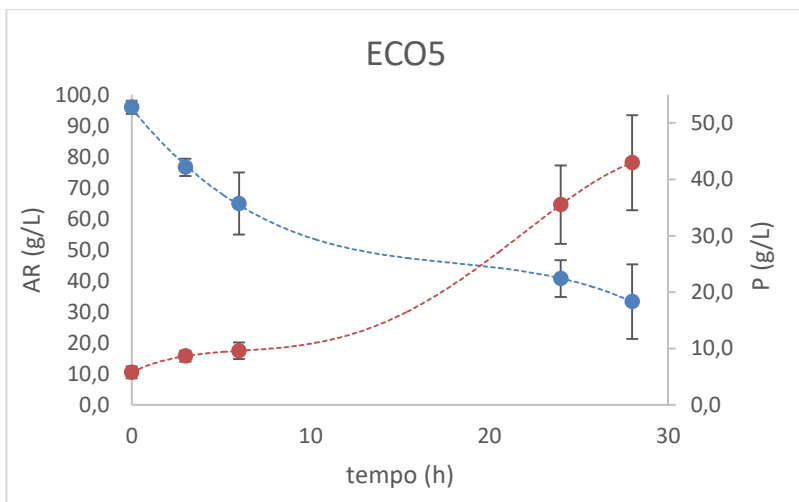
As Figuras 46, 47 e 48 apresentam os resultados obtidos nos experimentos para determinação do pH utilizado nos ensaios fermentativos com cocultura de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus*.

Figura 46: Cinética de consumo de glicose (AR) e formação de etanol (P) por cocultura microbiana de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* em pH 4,0.



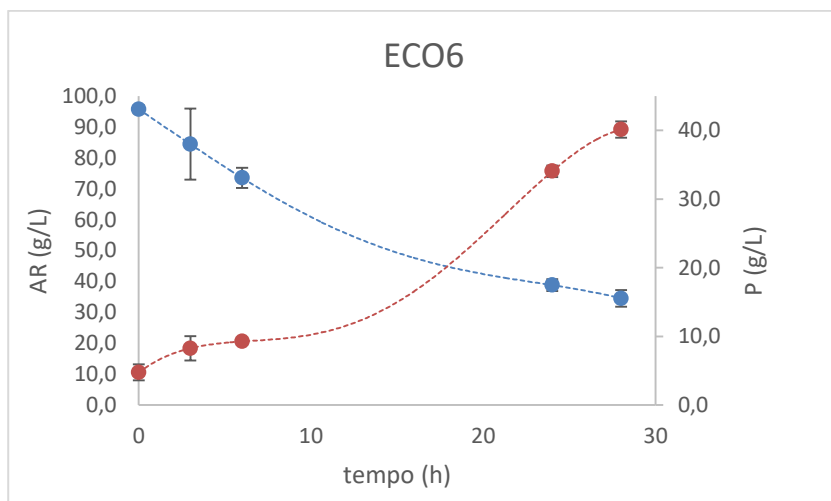
Fonte: Just (2015).

Figura 47: Cinética de consumo de glicose (AR) e formação de etanol (P) por cocultura microbiana de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* em pH 5,0.



Fonte: Just (2015).

Figura 48: Cinética de consumo de glicose (AR) e formação de etanol (P) por cocultura microbiana de *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* em pH 6,0.



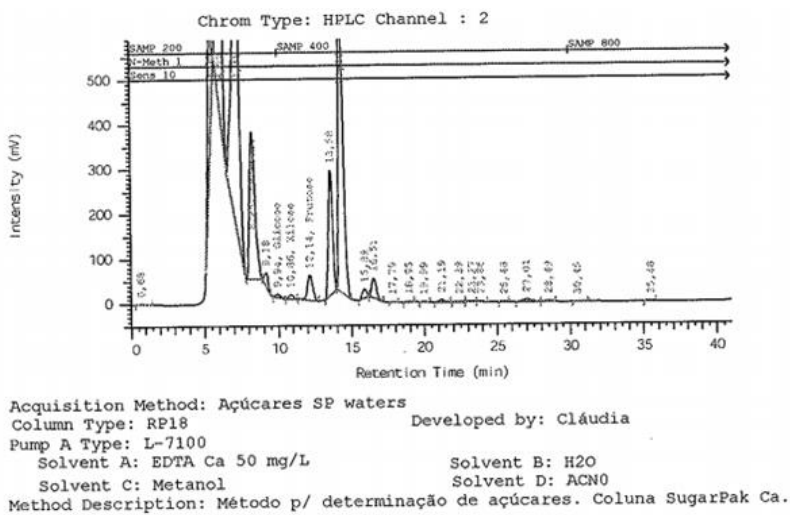
Fonte: Just (2015).

Empregando o método ANOVA com teste de Tuckey verificou-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o comportamento cinético (velocidade global de consumo de AR e formação de P) das três fermentações conduzidas em diferentes valores de pH. Sendo assim, optou-se pelo valor de pH intermediário (pH 5,0) para os ensaios de fermentação batelada repetida empregando como substrato mosto de pseudocaule sacarificado.

Apêndice 05

Na Figura 49 é mostrado um cromatograma da análise de açúcares realizada para confirmação da concentração de xilose nos ensaios.

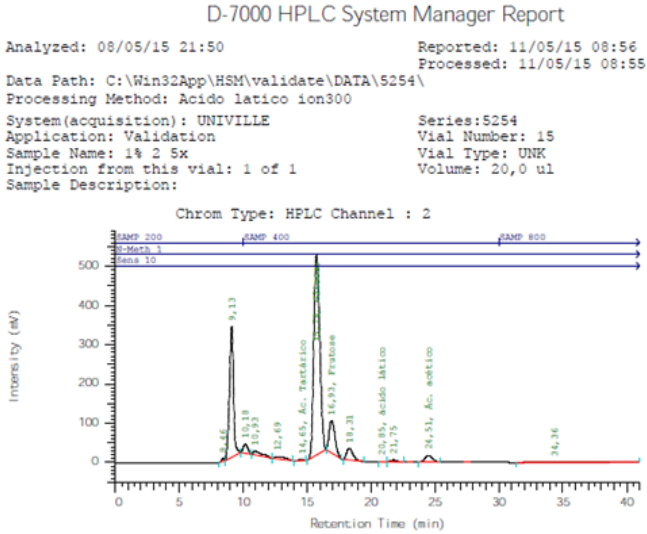
Figura 49: Cromatograma da análise de açúcares.



Apêndice 06

As Figuras 50, 51 e 52 apresentam os cromatogramas das análises em CG da remoção de compostos inibitórios.

Figura 50: Cromatograma dos compostos ácido acético, açúcares e ácido láctico.

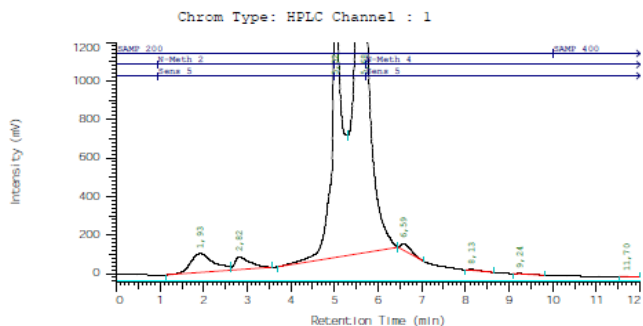


Fonte: Souza (2016).

Figura 51: Cromatograma do composto hidroximetilfurfural (HMF).

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 03/01/16 13:03	Reported: 27/04/16 09:47
	Processed: 27/04/16 09:46
Data Path: C:\Win32App\HSM\validate\DATA\5292\	
Processing Method: Hidroximetilfurfural	
System(acquisition): UNIVILLE	Series:5292
Application: Validation	Vial Number: 14
Sample Name: SCC2 FURF	Vial Type: UNK
Injection from this vial: 1 of 1	Volume: 20,0 ul
Sample Description:	

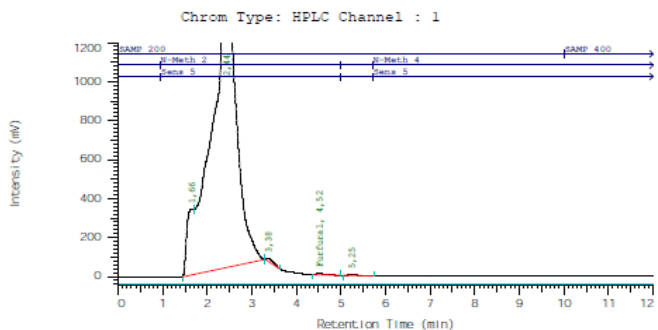


Fonte: Souza (2016).

Figura 52: Cromatograma referente ao composto furfural.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 17/09/15 10:29	Reported: 22/09/15 09:26
	Processed: 22/09/15 09:26
Data Path: C:\Win32App\HSM\validate\DATA\5280\	
Processing Method: Furfural	
System(acquisition): UNIVILLE	Series:5280
Application: Validation	Vial Number: 3
Sample Name: 142 M	Vial Type: UNK
Injection from this vial: 1 of 1	Volume: 20,0 ul
Sample Description:	



Fonte: Souza (2016).