



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR *Spathaspora*  
*passalidarum*: PROJETO CONCEITUAL E ESPECIFICAÇÕES DE PROCESSO**

Isabelle Cesa Rovaris

Florianópolis

2022

ISABELLE CESA ROVARIS

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO POR *Spathaspora*  
*passalidarum*: PROJETO CONCEITUAL E ESPECIFICAÇÕES DE PROCESSO**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina apresentado como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadores: Profa. Dra. Jaciane Lutz Ienczak

Dr. Felipe André Pavan

Florianópolis

2022

*Este trabalho é dedicado aos meus pais, Gladys e Edson (in memoriam), com todo meu amor e gratidão. Espero que estejam orgulhosos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, à toda a minha família, meus maiores incentivadores durante esta jornada.

Às minhas amigas da vida inteira, Ana Laura W. Rovaris, Monique S. Bettiol e Kamille F. Ronsoni, por sempre me apoiarem e acreditarem no meu potencial.

Aos amigos que fiz durante esses anos na UFSC, principalmente às minhas colegas de turma, Jádina Carina Pinheiro, Jackelyne Souza e Carolaine Grando, pela parceria e cumplicidade.

À minha orientadora, Profa. Dra. Jaciane Lutz Ienczak, e ao Dr. Felipe André Pavan, pelos ensinamentos, incentivo e por toda a paciência e dedicação a este trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao corpo docente do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, por fazerem parte da minha formação, tanto acadêmica quanto cidadã.

Aos membros da banca examinadora, prof. Dr. Agenor Furigo Jr. MSc. Isabela de Oliveira Pereira, por aceitarem o convite.

E, por fim, agradeço a todos que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a construção deste trabalho.

## RESUMO

Frente ao cenário atual, uma preocupação com a demanda energética mundial tem levado a discussões sobre formas sustentáveis de se produzir energia. A indústria sucroalcooleira produz toneladas de resíduos anualmente. O bagaço de cana-de-açúcar é uma matéria-prima rica em açúcares, majoritariamente glicose e xilose. Alguns microrganismos são capazes de converter esses açúcares em produtos e subprodutos, como etanol e xilitol. *Spathaspora passalidarum*, por ser uma levedura naturalmente fermentadora de pentoses e hexoses, é capaz de converter estes açúcares nos produtos já citados. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a possibilidade de produção de etanol de segunda geração em escala industrial, por meio da simulação de processo, baseada em dados da literatura. Também foi avaliada a capacidade de produção de xilitol. Inicialmente, determinou-se que a simulação ocorreria para uma planta que receba 28,4 toneladas de bagaço de cana-de-açúcar por hora para o processamento. A partir disto, determinaram-se as correntes de entrada e saída das operações de pré-tratamento e evaporação para remoção de inibidores. Para as etapas de produção de inóculo, propagação e fermentação foram realizados balanços de massa, para se obter as correntes de entrada e saída, além do dimensionamento do volume dos equipamentos, baseados em dados da literatura. A propagação precisou ser realizada em quatro etapas em reatores de 10, 1.000, 100.000 e 3.200.000 L, respectivamente, para alcançar a concentração de biomassa requerida. A fermentação ocorreu em um biorreator de 1.600.000 L, com concentração inicial de açúcares redutores de 87,9 g/L. Além disso, foram calculados os tempos de propagação e fermentação, sendo estes 59,8 e 16,3 h, respectivamente. Dessa forma, a partir dos balanços de massa e dos fatores de conversão de substrato em produto obtidos da literatura, calculou-se a produção de etanol, xilitol e células. O processo resultou em 53.420 kg de etanol/dia, 20.792 kg de xilitol/dia e 90.111 kg de células/dia. Concluiu-se que o processo de produção de etanol e xilitol por *S. passalidarum*, utilizando açúcares de segunda geração em larga escala, é possível, porém, devido a necessidade de operar em alta densidade celular, a quantidade de biorreatores de propagação com elevados volumes mostrou-se alta. Vale ressaltar que uma posterior análise econômica do processo se faz necessária para verificar a viabilidade de implantação de tal sistema em escala industrial.

Palavras-chave: *S. passalidarum*, xilose, xilitol, fermentação, propagação, larga escala.

## ABSTRACT

Concerns with world energy demand has led to discussions about sustainable ways to produce energy. The sugar-alcohol industry produces tons of waste annually. Sugarcane bagasse is a raw material rich in sugars, mainly xylose and glucose. Some microorganisms are able to convert these sugars into products and by-products, such as ethanol and xylitol. *Spathaspora passalidarum*, being a naturally pentose and hexose fermenting yeast, is able to convert reducing sugars in these products. Thus, the present work aimed to evaluate the possibility of producing second-generation ethanol on an industrial scale, through process simulation and literature data. The xylitol production capacity was also evaluated. Initially, it was determined that the simulation would be based in a plant that receives 28.4 tons of sugarcane bagasse per hour to process. From that, the inlet and the outlet streams for pre-treatment and evaporation operations were determined. For inoculum preparation, propagation and fermentation, mass balances were performed to obtain the inlet and outlet streams, in addition to the dimensioning of the volumes of the equipments. Propagation had to be carried out in four steps in reactors of 10, 1000, 100000 and 3200000 L, respectively, to achieve a suitable biomass concentration. Fermentation took place in a 1600000 L bioreactor, with an initial reducing sugar concentration of 87.9 g/L. In addition, propagation and fermentation times were calculated, which were 59.8 and 16.3 h, respectively. Thus, from the mass balances and the substrate-to-product conversion factors, obtained from the literature, ethanol, xylitol and cells production were calculated. The process resulted in 53420 kg of ethanol, 20792 kg of xylitol and 90111 kg of cells produced per day. It was concluded that the ethanol production process by *S. passalidarum*, using second generation sugars on a large scale, is possible, but due to the necessity of operating on high biomass concentration, the amount of propagation bioreactors with large volumes showed to be high. It is worth to emphasize that an economic assessment of the proposed process is needed to verify the viability of its implementation on industrial scale.

Keywords: *S. passalidarum*, xylose, xylitol, fermentation, propagation, large scale.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da celulose (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009 apud FERREIRA, 2015).....	15
Figura 2 – Estrutura molecular da hemicelulose (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009 apud FERREIRA, 2015).....	15
Figura 3 – Estrutura molecular da lignina (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009 apud FERREIRA, 2015).....	16
Figura 4 – Formação de compostos inibitórios durante o processo de pré-tratamento (adaptado de PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000 apud PEREIRA, 2020).....	17
Figura 5 – Modelo da parede celular mostrando o efeito geral do pH na solubilização da hemicelulose e lignina (GARLOCK et al., 2011 apud ALBARELLI, 2013).....	18
Figura 6 – Via metabólica da fermentação de etanol em <i>S. cerevisiae</i> (BAI et al., 2008 apud CINELLI, 2012).....	21
Figura 7 – Vias de produção de etanol a partir de xilose. Via XR-XDH (xilose redutase e xilitol desidrogenase), encontrada em leveduras e fungos filamentosos. Via XI (xilose isomerase), encontrada principalmente em bactérias (adaptado de KUHAD et al., 2011 apud PEREIRA, 2020).....	23
Figura 8 – Leveduras do gênero <i>Spathaspora</i> (CADETE & ROSA, 2018).....	24
Figura 9 – Via metabólica simplificada de <i>S. passalidarum</i> a partir de glicose e xilose como fontes de carbono, destacando os principais produtos e subprodutos formados, bem como as principais enzimas e cofatores envolvidos (BONAN et al., 2021).....	26
Figura 10 – Fluxograma da produção de etanol e xilitol (H.H. refere-se ao hidrolisado hemicelulósico e SCP refere-se ao termo <i>Single Cell Protein</i> ) (AUTORA, 2022).....	29
Figura 11 – Relação entre a produtividade e a concentração inicial de células nas fermentações em biorreator com a levedura recombinante MP-C5H1 em batelada e meio rico. A linha pontilhada representa o ajuste polinomial dos pontos (PEREIRA, 2020)...	34
Figura 12 - Fluxograma completo da produção de etanol de segunda geração, xilitol e SCP por <i>S. passalidarum</i> (AUTORA, 2022).....	37

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Equipamentos utilizados para cada etapa de <i>downstream</i> (AUTORA, 2022).....	42
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do bagaço de cana-de-açúcar (adaptado de DIONÍSIO et al., 2021).....	30
Tabela 2 – Componentes da corrente que sai do pré-tratamento e porcentagens de recuperação dos componentes no concentrado e condensado após evaporação (adaptado de DIONÍSIO et al, 2021 e ROQUE et al., 2019).....	31
Tabela 3 – Parâmetros cinéticos para preparação de inóculo e propagação (adaptado de BONAN, 2018).....	32
Tabela 4 – Fatores de conversão utilizados na etapa de fermentação (adaptado de MARTINEZ-JIMENEZ et al, 2021 e BONAN et al., 2021).....	33
Tabela 5 – Correntes de entrada e saída das operações de pré-tratamento e evaporação (AUTORA, 2022).....	36
Tabela 6 – Corrente de saída do concentrado em relação aos açúcares (AUTORA, 2022).....	38
Tabela 7 – Concentrações iniciais e finais de células e AR para cada etapa de preparação de inóculo e propagação (AUTORA, 2022).....	39
Tabela 8 – Correntes de entrada e saída nas etapas de preparação de inóculo e propagação (AUTORA, 2022).....	39
Tabela 9 – Velocidades de agitação calculadas para cada etapa (AUTORA, 2022).....	40
Tabela 10 – Correntes de entrada e saída do fermentador (AUTORA, 2022).....	41
Tabela 11 – Produção diária de etanol, xilitol e células (AUTORA, 2022).....	42

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo geral .....	13
2.1.1 Objetivos específicos.....	13
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>14</b>
3.1 Produção de etanol de segunda geração.....	14
3.1.1 Matéria-prima lignocelulósica.....	14
3.1.2 Pré-tratamento.....	16
3.1.3 Hidrólise do material lignocelulósico.....	18
3.1.4 Fermentação.....	20
3.2 Leveduras na produção de bioetanol de segunda geração.....	22
3.2.1 <i>Spathaspora passalidarum</i> .....	23
3.3 Simulação da produção de bioetanol.....	27
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 Matéria-prima e alimentação.....	29
4.2 Pré-tratamento e evaporação para remoção de compostos tóxicos à fermentação.....	30
4.3 Microrganismo.....	31
4.4 Preparação de inóculo e propagação.....	31
4.5 Centrifugação.....	33
4.6 Fermentação.....	33
4.7 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) e agitação.....	34
4.8 <i>Downstream</i> .....	35
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
5.1 Pré-tratamento e evaporação para remoção de compostos tóxicos.....	36
5.2 Produção de inóculo e propagação.....	38
5.3 Condições de agitação e aeração para propagação e fermentação.....	40
5.4 Centrifugação.....	40
5.5 Fermentação.....	40
5.6 <i>Downstream</i> .....	41
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a demanda de energia mundial, além da necessidade de preservação do meio ambiente, tem aumentado o interesse na procura por fontes renováveis que substituam os combustíveis fósseis (PEREIRA et al., 2015). O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores agrícolas do mundo, logo, também é responsável por gerar grandes quantidades de resíduos agroindustriais, como cascas, folhas e palhas (FERREIRA, 2015). Portanto, pesquisas que visam o uso de bioprodutos extraídos, recuperados ou sintetizados para a aplicação direta na indústria, em biorrefinarias, são essenciais por se tratar de uma abordagem sustentável, buscando uma economia futura baseada em fontes biológicas e com mínima geração de resíduos e poluentes (FITZPATRICK et al., 2010 apud BONAN et al., 2021).

Entre as possíveis fontes de bioenergia, as biomassas lignocelulósicas destacam-se como matérias-primas de grande potencial para a produção de biocombustíveis, além de outros produtos de valor agregado (PEREIRA et al., 2015). A utilização do bagaço da cana-de-açúcar, resíduo industrial da produção de etanol de primeira geração, como biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração é bastante promissora, pois contém grandes quantidades de açúcar (27-32 % de hemicelulose, 32-44 % de celulose e 19-24 % de lignina), tem uma ampla disponibilidade e não compete com a indústria de alimentos (BONAN et al., 2021; CARDONA et al., 2010 apud PEREIRA, 2020).

Para a produção do bioetanol de segunda geração, primeiramente são empregados processos químicos, físicos ou biológicos, ou a combinação destes, para a hidrólise da celulose e hemiceluloses e consequente liberação de açúcares e, então, o processo é concluído por meio de processo de fermentação alcoólica convencional (FERREIRA, 2015).

A hidrólise da celulose gera glicose e celobiose (dímero de glicose), enquanto a hidrólise da hemicelulose gera xilose, arabinose e glicose. Já a lignina, polímero que também compõe a bagaço de cana-de-açúcar possui uma estrutura complexa, formada por unidades moleculares de fenilpropano substituídos com vários grupos funcionais e quando hidrolisada libera compostos fenólicos que são tóxicos para a fermentação (Referência).

Diferentes microrganismos podem ser usados em processos de produção de etanol de segunda geração (BIAZI et al., 2020). Leveduras do gênero *Saccharomyces* têm sido utilizadas tradicionalmente para a produção de etanol, tanto de primeira quanto de

segunda geração, contudo, como estas não são capazes de metabolizar pentoses presentes na hemicelulose, só é possível utilizá-las quando a fonte de carbono provém de hexoses, ou no caso de serem geneticamente modificadas (KIM et al., 2013 apud BIAZI et al., 2020) para o consumo deste açúcar de 5 carbonos. Tendo em vista que a fração hemicelulósica do bagaço de cana de açúcar é majoritariamente composta por açúcares de cinco carbonos (pentoses), como a xilose e a arabinose, *Spathaspora passalidarum*, levedura naturalmente fermentadora de pentoses e hexoses, possui grande potencial para ser aplicada industrialmente, tendo sido objeto de estudo na última década (BONAN et al., 2021; CADETE & ROSA., 2018).

*S. passalidarum* além de ser investigada, em maior parte, para produção de etanol de segunda geração, também é capaz de produzir xilitol em quantidades significativas (BONAN et al., 2021). Apesar de ser tratado como um subproduto da fermentação do etanol, o xilitol tem um mercado mundialmente promissor, pois os consumidores estão cada vez mais preocupados com a saúde e este é um açúcar com poder adoçante semelhante a sacarose, características anticariogênicas e metabolismo independente de insulina, tornando-o um produto de alto valor agregado (XU et al., 2019).

Desta forma, este estudo visa avaliar o desempenho da levedura *S. passalidarum* no processo fermentativo para a produção de etanol de segunda geração, além de analisar a recuperação de xilitol, como um subproduto, ao final do processo.

Com o intuito de analisar o processo em escala industrial, é necessário fazer um projeto de instalação e execução do bioprocessamento e, para tal, executa-se o projeto conceitual (BENAVIDES et al., 2020). O projeto conceitual é visto como a mais importante fase do processo de projeto, pois são as decisões tomadas ali que influenciarão nas fases seguintes do processo, além de ser uma atividade voltada para a concepção de um produto auxiliando na otimização do processo (FERREIRA, 1997).

Neste contexto, o presente trabalho visou a utilização de dados obtidos da literatura para a elaboração do escalonamento da produção de etanol e xilitol de segunda geração a partir de *S. passalidarum*, utilizando o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar como substrato para fermentações. Além disso, as operações unitárias e equipamentos usados serão especificados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver o escalonamento do processo para a produção de etanol de segunda geração e xilitol, a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando a levedura *Spathaspora passalidarum*, com base em resultados obtidos na literatura.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- Obter da literatura, dados de composição do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, composição das correntes geradas após pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e concentração do hidrolisado hemicelulósico para a etapa de fermentação;
- Obter parâmetros cinéticos da produção de células (etapa de propagação), etanol e xilitol de segunda geração por *S. passalidarum* na literatura;
- Especificar equipamentos e suas utilidades para o desenvolvimento do processo;
- Realizar o balanço de massa e escalonamento do sistema.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Produção do etanol de segunda geração**

O Brasil é um dos países que já realizou considerável progresso na busca pela substituição dos combustíveis fósseis pelo etanol renovável de cana-de-açúcar. Além disso, o Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar e lidera, junto com os Estados Unidos, a produção global de bioetanol (CONAB, 2020; RFA, 2020). A terceira estimativa da safra 2021/22 de cana-de-açúcar no Brasil indica produção de 568,4 milhões de toneladas, com esse volume de cana deve ser produzido 24,8 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2021).

O aumento da demanda por bioetanol nos últimos anos incentivou a busca por uma alternativa para evitar que haja um limite de oferta ou a competição pelo uso da terra para geração de energia e produção de alimentos (FERREIRA, 2015). Na indústria da cana-de-açúcar, grandes quantidades de resíduos de material lignocelulósico são gerados durante a produção de etanol e açúcar (PEREIRA et al., 2015). Sendo assim, o bioetanol de segunda geração tem sido extensivamente estudado em todo o mundo com grande enfoque aos possíveis processos de produção (ALBARELLI, 2013).

A produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos é geralmente realizada em cinco etapas principais: pré-tratamento da biomassa, hidrólise enzimática da celulose, fermentação, recuperação do etanol e tratamento de efluentes (ALBARELLI, 2013).

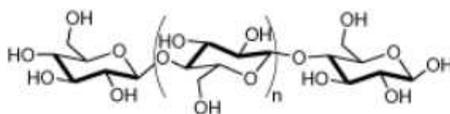
##### **3.1.1 Matéria-prima lignocelulósica**

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas majoritariamente pelos polissacarídeos celulose e hemiceluloses, entremeados por outra macromolécula formada por álcoois aromáticos, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio (LEE, 1997 apud FERREIRA, 2015). O bagaço de cana-de-açúcar apresenta significativa heterogeneidade morfológica e consiste em feixes de fibras e outros elementos estruturais (CARDONA et al., 2010 apud PEREIRA, 2020).

Em relação a composição, a fração celulósica corresponde a 32-44 % do material (CARDONA et al., 2010 apud PEREIRA, 2020). A celulose é um polímero linear de celobiose (dímero glicose-glicose) e a posição das ligações e as pontes de hidrogênio

adicionais tornam o polímero rígido e difícil de ser hidrolisado (Figura 1) (HAMELINCK et al., 2005 apud FERREIRA, 2015).

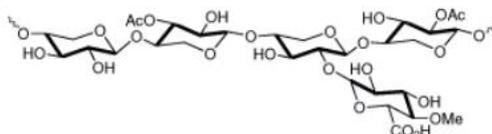
**Figura 1** – Estrutura molecular da celulose



**Fonte:** Ferreira; Rocha; Silva (2009) apud Ferreira (2015).

Já a fração hemicelulósica (27-32 % do material lignocelulósico) consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose (FERREIRA, 2015; CARDONA et al., 2010 apud PEREIRA, 2020). A figura 2 representa a estrutura molecular da hemicelulose.

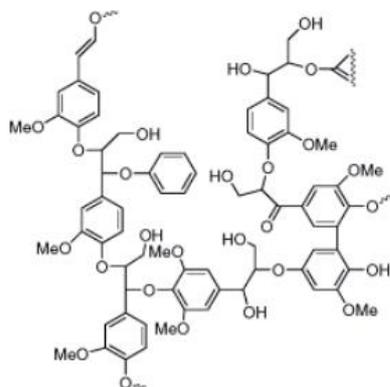
**Figura 2** – Estrutura molecular da hemicelulose



**Fonte:** Ferreira; Rocha; Silva (2009) apud Ferreira (2015).

A estrutura bioquímica da lignina não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo pretendida para a produção de bioetanol por rotas fermentativas (FERREIRA, 2015), sua estrutura molecular está representada na Figura 3. A lignina é um polímero complexo, cuja natureza hidrofóbica e as fortes ligações químicas com a celulose e a com a hemicelulose fazem com que ela desempenhe um papel de proteção na estrutura da biomassa contra o ataque de microrganismos (FENGEL e WEGENER, 1989 apud PEREIRA, 2020). Mesmo presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, a lignina confere limitação suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente o processo de sacarificação, importante para a produção de bioetanol, o que ocasiona a necessidade de um pré-tratamento do material lignocelulósico (SILVA, 2012 apud FERREIRA, 2015).

**Figura 3** - Estrutura molecular da lignina



**Fonte:** Ferreira; Rocha; Silva (2009) apud Ferreira (2015).

A celulose e a hemicelulose correspondem às frações de polissacarídeos que podem ser extraídas, fermentadas e transformadas em etanol, dando origem ao etanol de segunda geração (2G) (CARDONA et al., 2010 apud PEREIRA, 2020).

### 3.1.2 Pré-tratamento

O pré-tratamento consiste na separação seletiva dos componentes da biomassa, por meio da ruptura do complexo de hemicelulose-lignina-celulose (ALBARELLI, 2013). Vários métodos de pré-tratamento têm sido estudados para modificar a estrutura rígida que caracteriza a biomassa lignocelulósica, podendo ser classificados como físicos (moagem, irradiação), químicos (ácido, alcalino, com solventes orgânicos) e físico-químicos (explosão a vapor, hidrotérmicos e oxidação úmida) (MOSSIER et al., 2005 apud ZÚÑIGA, 2010). No Brasil, os modelos mais estudados e aplicados por empresas desenvolvedoras de tecnologia são explosão a vapor e ácido diluído (COSTA, 2016).

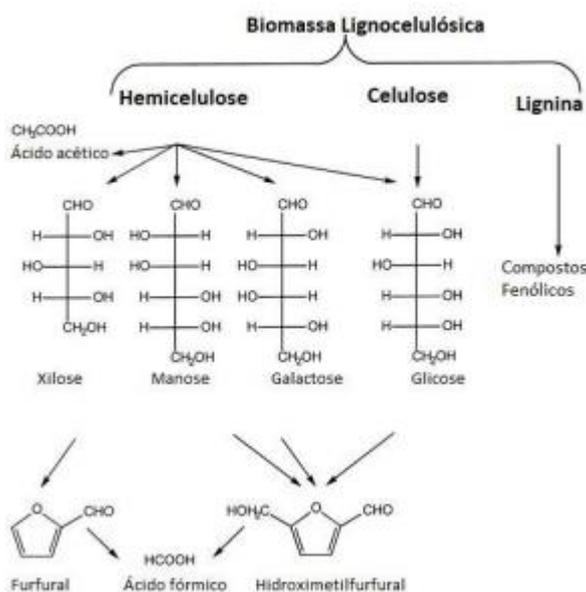
O objetivo principal do pré-tratamento é remover a lignina e as hemiceluloses, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material, além disso, esse processo deve melhorar também a formação de açúcares ou habilidade de formação futura de açúcares por hidrólise, evitar degradação ou perda de carboidratos e a formação de coprodutos inibidores para a hidrólise subsequente e a fermentação (SAHA et al., 2005 apud FERREIRA, 2015).

Inibidores são formados ou liberados durante a etapa de pré-tratamento e podem ser classificados como ácidos fracos (acético, fórmico e levulínico), derivados de furano (hidroximetilfurfural (HMF) e furfural) e compostos fenólicos da lignina (JÖNSSON et al., 2016; VAN DER POL et al., 2014 apud LIMA et al., 2021). HMF é gerado a partir

da desidratação das hexoses (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000; ALMEIDA et al., 2007 apud PEREIRA, 2020). Da desidratação das pentoses, presentes na hemicelulose, o principal subproduto é o furfural (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000 apud PEREIRA, 2020). Já os ácidos acético e fórmico são gerados, respectivamente, a partir da desacetilação da hemicelulose e da degradação do furfural e HMF (PEREIRA, 2020) (Figura 4). O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído é considerado eficaz para a recuperação de xilose e arabinose (mais de 97 %), porém libera inúmeros compostos tóxicos formados pela degradação de açúcares (HMF, furfural) e lignina (fenólicos), além de ácidos orgânicos (ácido acético) (ROQUE et al., 2019), se as condições de reação não forem bem controladas (LIMA et al., 2021).

O efeito dos inibidores HMF, furfural e ácido acético sobre as leveduras *S. passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis* (muito utilizada para a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos devido a capacidade de consumir xilose) foi avaliado e verificou-se o efeito inibitório destes compostos sobre os parâmetros fermentativos destas leveduras (SOARES, 2018 apud PEREIRA, 2020). A levedura *S. passalidarum* se mostrou mais sensível aos inibidores, no entanto, apresentou melhor desempenho fermentativo de xilose em relação à *S. stipitis*. A figura 4 representa a formação de compostos inibitórios durante o processo de pré-tratamento.

**Figura 4** – Formação de compostos inibitórios durante o processo de pré-tratamento.

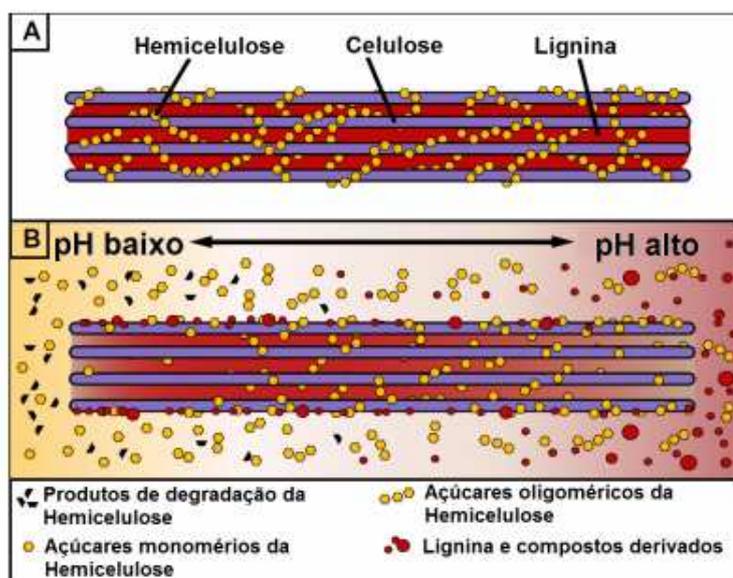


**Fonte:** adaptado de Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000) apud Pereira (2020).

A etapa de pré-tratamento é crucial para possibilitar bons rendimentos de obtenção de açúcares, os rendimentos da hidrólise enzimática sem prévio pré-tratamento, em geral, são menores que 20 %, enquanto que com pré-tratamento, o rendimento pode ser maior que 90% (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAAIJ, 2005 apud ALBARELLI, 2013).

A Figura 5 mostra o comportamento da hemicelulose e da lignina presentes na biomassa mediante pré-tratamento utilizando diferentes condições de pH. Quando o pré-tratamento é conduzido a valores baixos de pH, mais hemicelulose é removida da biomassa formando xilose e produtos de degradação, enquanto a solubilização da lignina, deslignificação do material, se dá quando utilizados valores altos de pH (GARLOCK et al., 2011 apud ALBARELLI, 2013).

**Figura 5** – Modelo da parede celular mostrando o efeito geral do pH na solubilização da hemicelulose e lignina. Nota: (A) da parede celular não tratada e (B) da parede celular durante o pré-tratamento.



**Fonte:** Garlock et al. (2011) apud Abarelli (2013).

### 3.1.3 Hidrólise do material lignocelulósico

Na hidrólise, a celulose é convertida em glicose, que ocorre espontaneamente em água pura, entretanto, este processo é extremamente lento (ALBARELLI, 2013). Desta forma, duas opções tecnológicas são apresentadas como as mais relevantes na obtenção de açúcares a partir da celulose: a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática (ZÚÑIGA, 2010).

A hidrólise ácida pode ser conduzida utilizando ácido concentrado ou diluído em diferentes condições de temperatura (GURGEL, 2010 apud ALBARELLI, 2013). A hidrólise com ácido diluído apresenta rendimentos em relação à formação de glicose de 50 a 60 %, enquanto a hidrólise com ácido concentrado apresenta rendimento superior, empregando menores temperaturas (GURGEL, 2010 apud ALBARELLI, 2013). As grandes desvantagens desse método são: a formação de inibidores para a fermentação microbiana, necessidade de recuperação do catalisador, custo de equipamentos é elevado pois é necessária a construção de reatores resistentes à corrosão, as instalações representam elevados riscos à integridade do processo e a operação gera efluentes tóxicos (ALBARELLI, 2013; BASTOS, 2007 apud ZÚÑIGA, 2010).

A hidrólise enzimática vem demonstrando melhores resultados em relação à hidrólise ácida para a fermentação devido à não-degradação da glicose e não formação de inibidores (ALBARELLI, 2013). Enzimas como celulasas, sintetizadas por fungos e bactérias, trabalham em conjunto para degradar a celulose e outros polissacarídeos na biomassa (FERREIRA, 2015). Este método fornece uma utilização mais eficiente dos carboidratos, pois as enzimas celulasas apresentam elevada especificidade de ação sobre a celulose (ZÚÑIGA, 2010).

Muitos fatores podem afetar a hidrólise enzimática como, por exemplo: a concentração de substrato, a atividade da celulase e as condições de reação (temperatura, pH, assim como outros parâmetros) (ZÚÑIGA, 2010). Essa tecnologia enfrenta alguns entraves quanto a sua aplicação a nível comercial como o alto custo das enzimas, tempo de reação elevado, baixa concentração de sólidos no processo, resultando em um reator de hidrólise com grande volume e baixa concentração de açúcares no hidrolisado (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010 apud ALBARELLI, 2013). Para melhorar o rendimento e a velocidade de hidrólise, é necessário otimizar o processo e reforçar a atividade das celulasas (SUN; CHENG, 2002 apud FERREIRA, 2015).

O complexo enzimático de celulasas é constituído por uma mistura de várias enzimas (endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase) que hidrolisam a celulose para produzir glicose (FERREIRA, 2015; ZÚÑIGA, 2010). A obtenção de preparados com alta atividade celulolítica depende do microrganismo utilizado e do processo de produção das enzimas (ZÚÑIGA, 2010). Como resultado da ação das enzimas na celulose são obtidos glicose e celobiose. Contudo, com o aumento da concentração desses monômeros no meio, as atividades das celulasas são inibidas, sendo a celobiose um inibidor mais forte que a glicose. Portanto, é interessante que celobiose seja transformada

em glicose pelas glicosidasas. (FERREIRA, 2015). Quando os complexos enzimáticos apresentam baixas concentrações de  $\beta$ -glicosidase, é indicado que se adicione  $\beta$ -glicosidase de outras fontes para diminuir a concentração de celobiose no meio reacional e, conseqüentemente, a inibição (SUN; CHENG, 2002 apud FERREIRA, 2015).

Devido a viabilidade econômica do etanol de segunda geração depender fortemente do abastecimento de enzimas a preços competitivos, as empresas Genecor e Novozymes vêm lançando continuamente no mercado preparados celulósicos mais aprimorados e a menores custos (ZÚÑIGA, 2010).

### 3.1.4 Fermentação

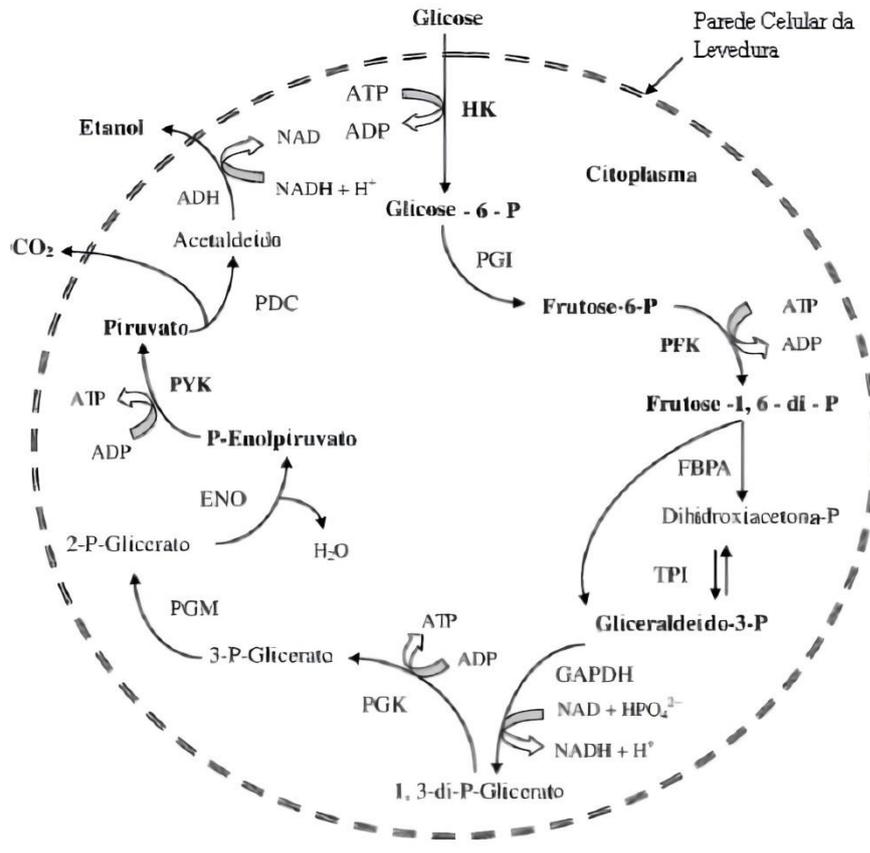
Após hidrólise da celulose, a solução resultante rica em glicose pode ser misturada com o líquido obtido do pré-tratamento (quando ácido diluído é utilizado, por exemplo), o qual se denomina hidrolisado hemicelulósico, e ser convertida em etanol por fermentação. A hidrólise e fermentação em separado (SHF), é uma das configurações mais extensivamente testadas em laboratório e em escala piloto e, possivelmente, é o processo mais maduro para a transformação de materiais lignocelulósicos em etanol (SUPING et al., 2009 apud ALBARELLI, 2013). A tendência atual caminha para a integração dos processos de hidrólise e fermentação, combinados em uma só etapa (SSF), sendo as principais vantagens do processo simultâneo: a maior produção de etanol e menor quantidade de enzima necessária (ALBARELLI, 2013). Outro processo comumente utilizado é o de sacarificação e cofermentação (SSCF), que consiste na hidrólise da celulose realizada simultaneamente à cofermentação de ambos os açúcares C6 (hexoses) e C5 (pentoses) (ALBARELLI, 2013).

A fermentação alcoólica ocorre por microrganismos capazes de converter açúcares em etanol por meio de uma série de reações bioquímicas, reguladas enzimaticamente (CINELLI, 2012). Poucos microrganismos possuem a capacidade de fermentar pentose e produzir etanol (FERREIRA, 2015), conforme citado anteriormente. *S. cerevisiae* é a levedura mais comumente empregada na indústria de produção de etanol, pois é tolerante a amplas faixas de pH fazendo com que o processo seja menos suscetível a contaminação (LIN et al., 2012 apud AZHAR et al., 2017) no entanto, não possui a capacidade de fermentar pentoses.

A principal via metabólica envolvida na produção do etanol em leveduras é a via glicolítica (Embden-Meyerhof): uma sequência de reações catalisadas por enzimas, em

que para cada molécula de glicose metabolizada, duas moléculas de piruvato são produzidas no citoplasma da célula (Figura 6) (BAI et al., 2008 apud CINELLI, 2012).

**Figura 6** – Via metabólica da fermentação de etanol em *S. cerevisiae*.



**Fonte:** Bai et al. (2008) apud Cinelli (2012).

Na primeira etapa, duas moléculas de ATP são utilizadas enquanto uma de glicose é fosforilada, reestruturada e quebrada em dois compostos de três carbonos: gliceraldeído 3-fosfato (GP) e diidroxiacetona fosfato (DHAP), que é imediatamente convertida em GP. Na segunda etapa, as duas moléculas de GP são oxidadas, em várias etapas, em duas moléculas de ácido pirúvico. Nessas reações, duas moléculas de  $\text{NAD}^+$  são reduzidas a NADH e quatro moléculas de ATP são formadas pela fosforilação em nível de substrato, com saldo final positivo de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose que é oxidada. Após a glicólise, as duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de  $\text{CO}_2$ . As moléculas de acetaldeído são então reduzidas utilizando-se duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de etanol, o produto final da fermentação (TORTORA et al., 2005 apud ANDRADE, 2014).

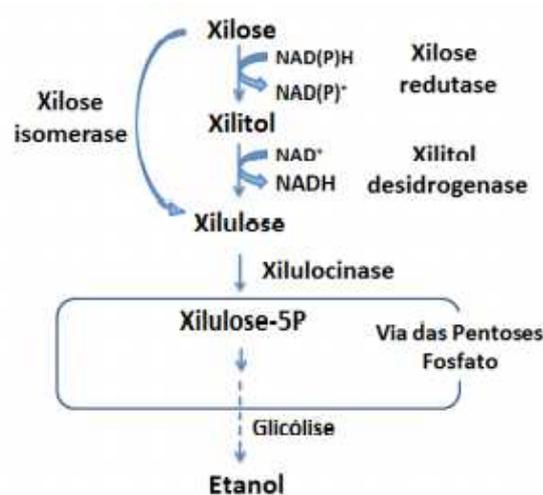
Apesar de *S. cerevisiae* ser a levedura mais utilizada na indústria para a produção de etanol (principalmente geneticamente modificada para o uso de xilose), outras leveduras fermentadoras de pentose são objetos de estudo e apresentam resultados promissores, como é o caso de *S. passalidarum*.

### 3.2 Leveduras na produção de bioetanol de segunda geração

Microrganismos capazes de produzir bioetanol a partir de pentoses podem ser naturalmente fermentadores ou geneticamente modificados para esta função. *S. cerevisiae* é o hospedeiro mais utilizado para a construção de leveduras geneticamente modificadas para o consumo de xilose por apresentar elevados títulos e rendimentos em etanol, alta tolerância a concentração de etanol no meio e a açúcares (VAN ZHYL et al., 2007; STAMBUK, 2019 apud PEREIRA, 2020). Já entre as leveduras naturalmente fermentadoras de xilose, destacam-se as espécies *Scheffersomyces (Picchia) sp.*, *Candida sp.*, *Spathaspora sp.* e *Pachysolen sp.*, extensivamente estudadas (COSTA, 2016).

A xilose é um monossacarídeo formado por cinco carbonos (pentose), sendo um dos principais constituintes da hemicelulose, e pode ser utilizada como fonte de carbono por leveduras no processo de produção de etanol, o que se deve a um conjunto de reações mediadas por enzimas específicas.

**Figura 7** – Vias de produção de etanol a partir de xilose. Via XR-XDH (xilose redutase e xilitol desidrogenase), encontrada em leveduras e fungos filamentosos. Via XI (xilose isomerase), encontrada principalmente em bactérias.



**Fonte:** adaptado de Kuhad et al. (2011) apud Pereira (2020).

As leveduras e fungos assimilam a xilose por um mecanismo de duas etapas, primeiro reduzindo o açúcar ao xilitol e depois reoxidando-o à xilulose, que é posteriormente metabolizada através da via de pentose-fosfato (não-oxidativa). Na maioria destes microrganismos, a redução da xilose é realizada por uma xilose redutase (XR) dependente de NADPH ou NADH, enquanto a oxidação do xilitol em xilulose, realizada pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), requer NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> (Figura 7) (HAHN HÄNGERDAL et al., 1994 apud PEREIRA, 2020; BONAN et al., 2020).

Alguns grupos de pesquisa têm trabalhado no isolamento de novas leveduras da biodiversidade, naturalmente fermentadoras de xilose, de forma a ampliar o banco de dados disponível e identificar uma levedura com o perfil robusto requerido para um processo industrial. Nesta linha, novas linhagens foram descobertas, como as leveduras do gênero *Spathaspora* (COSTA, 2016; NGUYEN et al., 2006; CADETE et al., 2013).

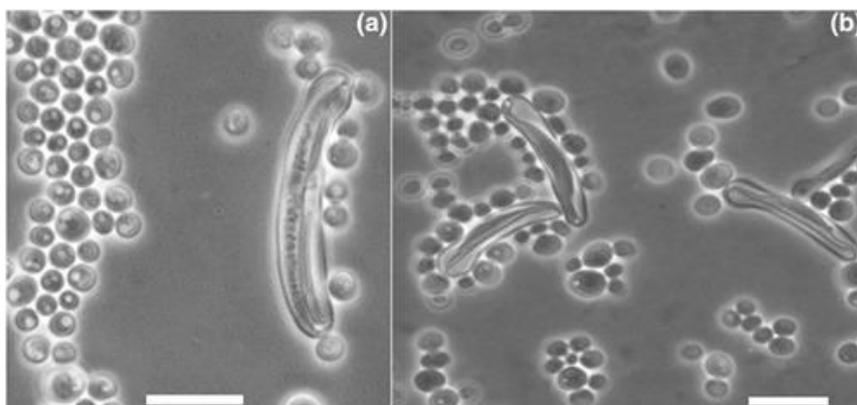
### 3.2.1 *Spathaspora passalidarum*

*S. passalidarum* é uma levedura do filo Ascomiceta do gênero *Spathaspora* (Figura 9), é uma levedura naturalmente consumidora e fermentadora de xilose (NGUYEN et al., 2006). Esta levedura possui proximidade taxonômica com outras

leveduras consumidoras de xilose como a *Candida jeffriesii* e *Candida lyospphila* conforme semelhanças encontradas em seus genes (NGUYEN et al., 2006).

A levedura *S. passalidarum* se destaca por apresentar rendimento e produtividade elevados em comparação aos fungos e bactérias capazes de metabolizar xilose (BARBOSA et al., 2009; CADETE et al., 2009; MOURO, 2012; NAKANISHI et al., 2017; FARIAS & FILHO, 2019; BONAN et al., 2019 apud PEREIRA, 2020).

**Figura 8** – Leveduras do gênero *Spathaspora*



**Fonte:** Cadete & Rosa (2018).

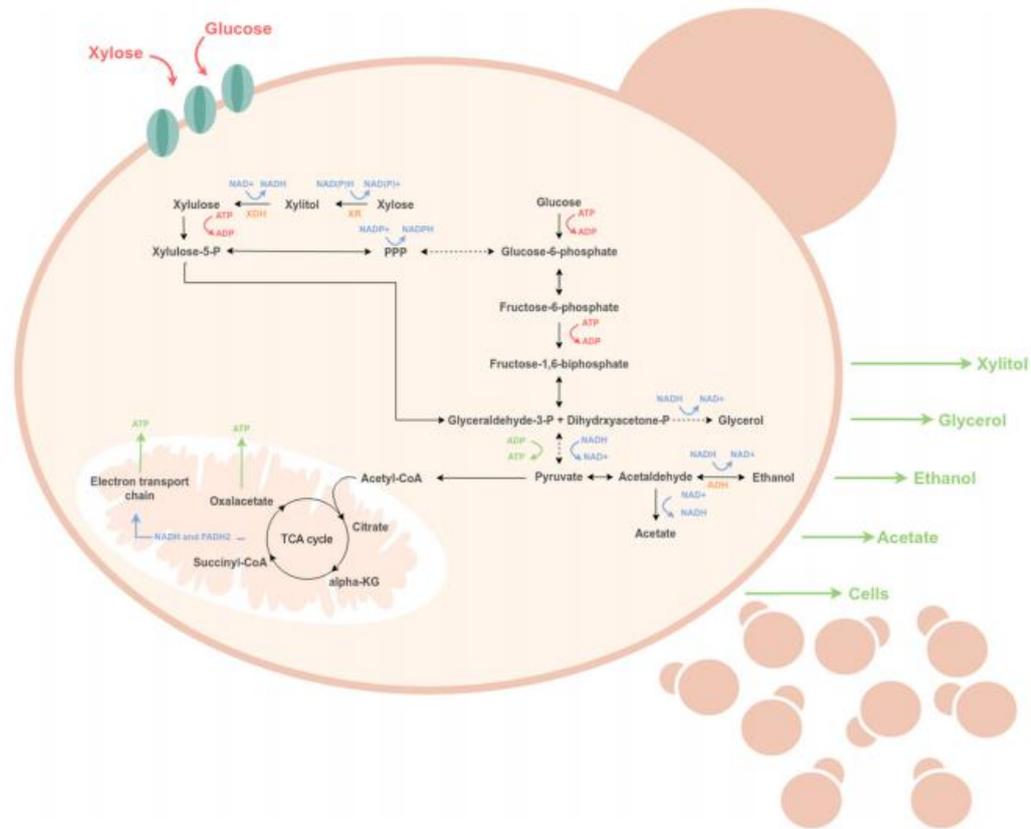
Nakanishi et al. (2017) comparou o desempenho de *S. passalidarum* com *S. stipitis* em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar hidrolisado com NaOH. Foram realizadas fermentações em biorreator, utilizando a estratégia de alta densidade celular, em modo batelada alimentada com reciclo de células (4 ciclos) e os resultados indicaram que a produção de bioetanol atingiu valores mais altos para *S. passalidarum* (21 g.L<sup>-1</sup>) que para *S. stipitis* (15 g.L<sup>-1</sup>).

Long et al. (2012) estudou *S. passalidarum* em cofermentações de glicose, xilose e celobiose e verificou que a assimilação dos outros açúcares não sofreu repressão pela presença de glicose no meio fermentativo nas condições estudadas.

*S. passalidarum* exibe altos rendimentos e produtividades de etanol quando cultivado em meios suplementados com esta pentose em condições de limitação de oxigênio. A espécie também exibe um rápido consumo de xilose e a capacidade de fermentar glicose, xilose e celobiose. Essas características sugerem que essa espécie é um potencial candidato para uso na fermentação de materiais lignocelulósicos (CADETE & ROSA, 2018).

Como mostrado na Figura 9, o xilitol é formado pela redução da xilose mediada por xilose redutase (XR), que tem especificidade para NADPH ou NADH. Em seguida, o xilitol é oxidado à D-xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), que tem especificidade para coenzima NAD<sup>+</sup>. A fosforilação de D-xilulose em D-xilulose-5-fosfato ocorre por ação da xiluloquinase (XK), que é então metabolizada na via pentose fosfato (PPP), originando glicose-6-fosfato. Na glicólise (via Embden-Meyerhof-Parnas), glicose-6-fosfato é convertida em piruvato, que, em condições anaeróbicas ou de baixa oxigenação, originam etanol por ação de álcool desidrogenase (ADH) e piruvato descarboxilase (PDC), promovendo a reoxidação de NADH (BONAN et al., 2021). Em condições aeróbicas, o piruvato é oxidado através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA) na cadeia respiratória (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007 apud BONAN et al., 2021). A presença de glicose no meio, promove a regeneração do NADPH via pentose fosfato, que é então usada por XR na conversão de xilose em xilitol (WANNAWILAI et al., 2017 apud BONAN et al., 2021). Além da produção de etanol pela levedura *S. passalidarum*, sabe-se que com controle do teor de açúcar e disponibilidade de oxigênio, é possível produzir xilitol e etanol no mesmo processo fermentativo, além de promover o crescimento celular (BONAN et al., 2021).

**Figura 9** – Via metabólica simplificada de *S. passalidarum* a partir de glicose e xilose como fontes de carbono, destacando os principais produtos e subprodutos formados, bem como as principais enzimas e cofatores envolvidos.



**Fonte:** Bonan et al. (2021).

A vantagem desta levedura estaria na especificidade de seus cofatores, tendo a enzima xilose redutase (XR) preferência por NADH, e a enzima xilose desidrogenase, por  $\text{NAD}^+$ . Dessa forma, os cofatores seriam naturalmente oxidados e reduzidos durante o metabolismo, reduzindo o acúmulo de xilitol no meio de cultivo (BONAN et al., 2021).

Ainda em estudo conduzido por Bonan e colaboradores (2021), sob as condições de  $k_{1a}$  de  $45 \text{ h}^{-1}$  e concentração inicial de xilose e glicose de 85 e 5 g/L, respectivamente, as concentrações finais de etanol e xilitol foram  $25.40 \pm 1.90$  e  $14.58 \pm 0.36$  g/L, respectivamente, e resultaram em valores de  $Q_P$  de  $0.96 \pm 0.01$  e  $0.61 \pm 0.01$  g/L h, respectivamente. A conversão de substrato em etanol ( $Y_{\text{EtOH/S}}$ ) foi de 0,26 g/g e  $Y_{\text{xilitol/S}}$  foi 0,17 g/g, não houve crescimento celular.

Já no estudo conduzido por Martinez-Jimenez e colaboradores (2021), na condição na qual a razão xilose:glicose é de 80:20 e concentração celular inicial de 18,05

g/L, os resultados estimados pela modelagem matemática foram  $Y_{X/S}$  de 4 g/g e  $Y_{EtOH/S}$  de 0,38 g/g.

### 3.3 Simulação da produção de bioetanol

Ferramentas de simulação de processos têm sido amplamente utilizadas no segmento sucroalcooleiro para tentar prever e melhorar a gestão agrícola da cana-de-açúcar (SINGH; ABEYGOONAWARDANA, 1982; VALLIS et al., 1996; SILVEIRA et al., 2000; O'LEARY, 2000 apud ALBARELLI, 2013).

A modelagem matemática de processos fermentativos pode ser definida como a tentativa de representar, através de equações matemáticas, os balanços de massa para cada componente do biorreator associados às complexas transformações bioquímicas que ocorrem nos processos e às velocidades com que estas reações se processam (BUENO, 2006).

A combinação do balanço de massa com as equações cinéticas das reações bioquímicas constitui uma descrição matemática adequada do processo fermentativo, no qual o modelo cinético pode ser utilizado para simular, até certo ponto, como as variáveis de saída podem ser influenciadas pelo conjunto de variáveis de entrada (MORAIS, 2019).

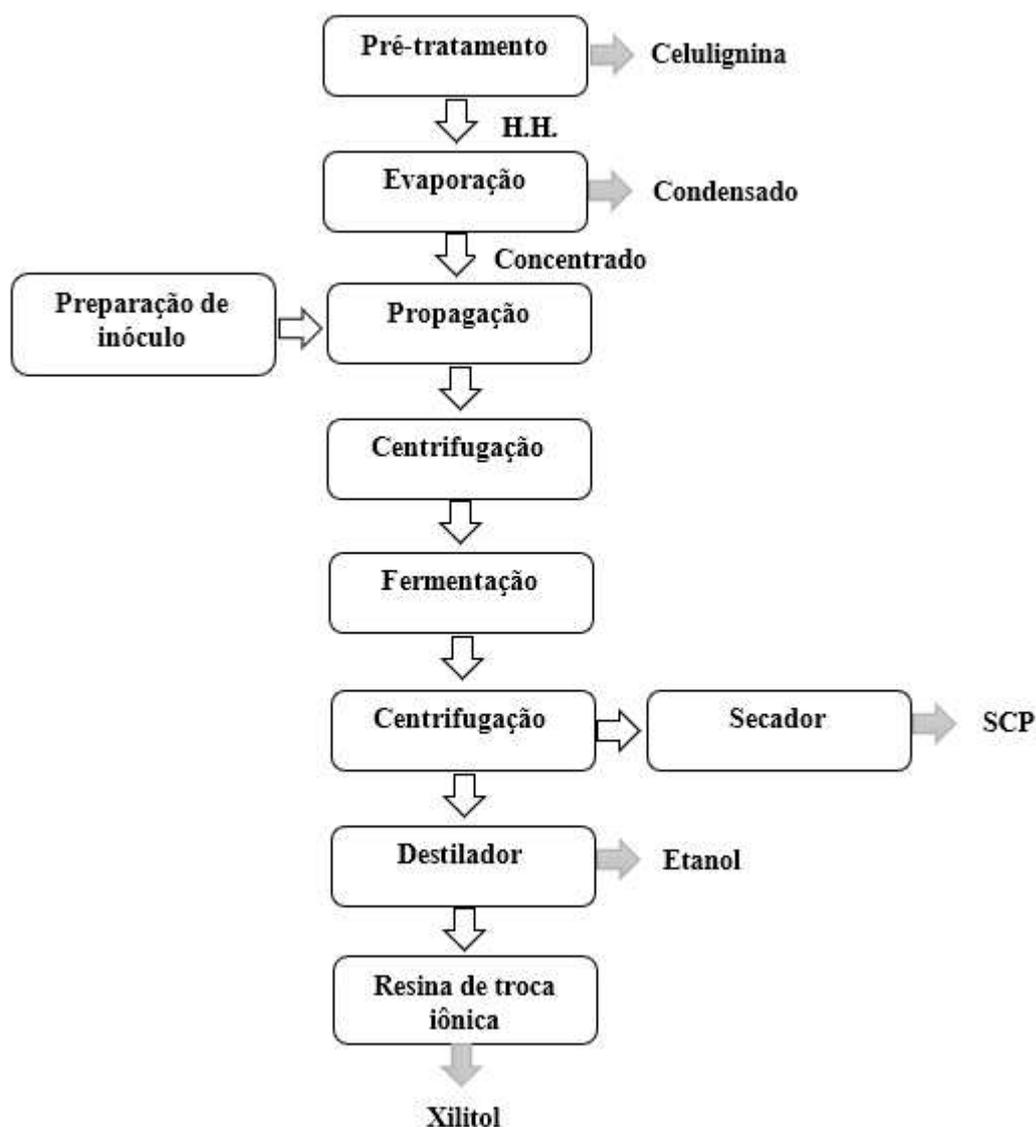
#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Desde 2017, o grupo de estudos da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Jaciane Lutz Ienczak pesquisa a aplicação da levedura *S. passalidarum* na produção de etanol de segunda geração. Contudo, todos os estudos foram obtidos em escala de bancada, logo, fez-se necessário um trabalho que abordasse a possibilidade de produção de bioetanol por *S. passalidarum* em escala industrial. Os dados utilizados para a construção do presente trabalho foram baseados nos estudos de Klein et al. (2017), Bonan (2018), Roque et al. (2019), Pereira (2020), Dionísio et al. (2021), Martinez-Jimenez et al. (2021) e Bonan et al. (2021).

O projeto de produção de etanol de segunda geração foi elaborado com base nos dados cinéticos, operações unitárias e matérias-primas obtidos a partir de dados da literatura. Para isso, foi fundamental a simulação do processo completo, desde a produção de hidrolisado hemicelulósico, inóculo necessário para a fermentação até as etapas de *downstream*. Foram utilizadas planilhas eletrônicas em Excel (Microsoft) para determinação dos balanços de massa.

Na Figura 10 está apresentado um diagrama de blocos referente às operações utilizadas para a obtenção dos produtos. É importante ressaltar que todas as operações foram tratadas considerando-se umidade em base seca.

**Figura 10** – Fluxograma da produção de etanol e xilitol (H.H. refere-se ao hidrolisado hemicelulósico e SCP refere-se ao termo *Single Cell Protein*)



Fonte: A autora (2022).

#### 4.1 Matéria-prima e alimentação

Para a determinação da capacidade de processamento, este trabalho se baseou no estudo de Klein et al. (2017), em que, o caso base se trata de uma destilaria que processa 4 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano, operando 24 h durante 330 dias no ano. Sendo o rendimento em bagaço de 25 % desta massa com umidade de 50 %, o resultado foi de 63,1 toneladas de bagaço processados por hora (base seca) (VASCONCELOS et al., 2013; ANDREOLI, 2008). Para base de cálculo considerou-se

que 55 % desse bagaço seria destinado à queima, resultando em um total de 28,4 toneladas de bagaço disponível por hora para a produção de bioetanol, xilitol e células.

A Tabela 1 mostra a composição de bagaço em base seca, baseado no estudo de Dionísio et al. (2021) e utilizado neste trabalho.

**Tabela 1** – Composição do bagaço de cana-de-açúcar

<b>Componentes</b>	<b>(%)</b>
Celulose	43,29
Arabinosilana	23,80
Lignina	18,24
Cinzas	1,50
Grupos acetil	2,63
Outros	10,54

**Fonte:** adaptado de Dionísio et al. (2021)

#### 4.2 Pré-tratamento e evaporação para remoção de compostos tóxicos à fermentação

Os dados referentes ao pré-tratamento foram obtidos do estudo de Dionísio e colaboradores (2021), no qual o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído foi o método utilizado.

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído descrito por Dionísio et al. (2021) foi realizado a 140 °C em um reator de liga de aço com carga de sólidos de 9 % (m/m) e 0,5 % (v/v) de solução de ácido sulfúrico, o aquecimento se deu por fluido de percolação através da camisa do reator operando a 150 rpm por 15 min. Ao final do processo, o reator foi resfriado, despressurizado e o material resultante foi dividido em frações sólida e líquida por um filtro Nutsche.

A fração líquida, produto de interesse deste estudo (rica em pentose), seguiu para um evaporador para a concentração do hidrolisado hemicelulósico (H.H.) e remoção de compostos tóxicos. Ácido acético, ácido fórmico, compostos fenólicos, HMF e furfural foram os principais inibidores removidos no processo. Os dados referentes a evaporação foram baseados no estudo de Roque et al. (2019).

A etapa de evaporação descrita por Roque et al. (2019) ocorreu em um evaporador rotativo a vácuo a 470 mbar (80 °C) e pH 1,67. O hidrolisado concentrado, resultado da operação, seguiu para os reatores de propagação.

No presente trabalho, tanto para a operação de pré-tratamento, quanto para a evaporação, foram consideradas apenas as correntes de entrada e saída, sem analisar as especificidades de cada processo.

A coluna H.H. (hidrolisado hemicelulósico), na Tabela 2, refere-se à porcentagem dos componentes na corrente de saída do pré-tratamento. Já a coluna de condensado, refere-se à porcentagem de componentes tóxicos extraídos no processo de evaporação e pode-se perceber que a extração é bastante efetiva para a maior parte dos inibidores.

**Tabela 2** – Componentes da corrente que sai do pré-tratamento e porcentagens de recuperação dos componentes no concentrado e condensado após evaporação

Componentes	Pré-tratamento	Evaporação	
	H.H. (%)	Recuperação no concentrado (%)	Recuperação no condensado (%)
Arabinose	6,19	100	-
Glicose	9,40	100	-
Xilose	65,67	100	-
Celobiose	2,79	100	-
Ácido fórmico	0,60	2	98
Ácido acético	10,29	35,1	64,9
HMF	0,13	-	100
Furfural	1,18	-	100
Compostos fenólicos	0,75	65,8	34,2
Outros	3,00	-	-

Fonte: adaptado de Dionísio et al. (2021) e Roque et al. (2019).

#### 4.3 Microrganismo

Os dados referentes ao cultivo (inóculo e propagação) do microrganismo foram obtidos do estudo de Bonan (2018). O microrganismo utilizado foi a levedura nativa não-convencional *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907. No estudo de referência, a cepa foi mantida em estoque em meio líquido YPX e glicerol (50 %) a -80 °C.

#### 4.4 Preparação de inóculo e propagação

Os parâmetros cinéticos referentes ao inóculo e a propagação foram baseados no estudo realizado por Bonan (2018). O inóculo foi preparado a partir de um *cryovial* da

levedura. O conteúdo de biomassa celular foi transferido para o meio do inóculo contendo glicose, xilose, extrato de levedura e sais (BONAN, 2018) e realizado em frasco Erlenmeyer a 30°C, 200 rpm e 24h.

A propagação proposta por Bonan (2018) foi realizada em batelada e o biorreator foi inoculado com meio de cultura contendo glicose, xilose, extrato de levedura e sais (BONAN, 2018) e o inóculo obtido conforme descrito anteriormente. A propagação ocorreu a fim de manter a porcentagem de oxigênio dissolvido no meio superior a 50 % em relação a saturação com ar atmosférico. A temperatura de 30 °C foi mantida e não houve correção de pH.

Com o objetivo de se atingir cerca de 18,5 g/L de concentração inicial de células no reator de fermentação (de acordo com Martinez-Jimenez et al., 2021) o escalonamento da propagação teve que ser dividido em 4 etapas, em tanques com volume crescente de 10, 1.000, 100.000 e 3.200.000 L, respectivamente.

A Tabela 3 refere-se aos parâmetros cinéticos para preparação de inóculo e propagação utilizados no presente trabalho, e foi elaborada a partir dos dados de Bonan (2018).

**Tabela 3** – Parâmetros cinéticos para preparação de inóculo e propagação

Parâmetro	Inóculo	Propagação
Conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ )	0,33 g <sub>cél.</sub> .g <sub>subs</sub> <sup>-1</sup>	0,68 g <sub>cél.</sub> .g <sub>subs</sub> <sup>-1</sup>
Produtividade média de células ( $P_X$ )	0,18 g. L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	1,69 g. L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
Velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_x$ )	-	0,33 h <sup>-1</sup>

Fonte: adaptado de Bonan (2018).

Considerou-se a propagação de *S. passalidarum* para a obtenção de alta densidade celular no biorreator de fermentação igual a 18,5 g/L de levedura (concentração inicial de células na fermentação), conforme estabelecido por Martinez-Jimenez et al. (2021).

O tempo de processo referente a preparação de inóculo e propagação foi calculado a partir da equação (1).

$$X = X_0 * e^{(\mu_x * t)} \quad (1)$$

Na qual,

X é a concentração final de células em g/L

X<sub>0</sub> é a concentração inicial de células em g/L

$\mu_x$  é a velocidade específica de crescimento celular em h<sup>-1</sup>

t é o tempo em h.

#### 4.5 Centrifugação

Todo o conteúdo resultante da propagação foi destinado para centrifugação, visando concentrar as células obtidas para a etapa subsequente de fermentação, para isso, centrífugas de disco foram selecionadas.

#### 4.6 Fermentação

O dimensionamento dos biorreatores de fermentação foi baseado na quantidade de H.H. restante após a propagação da levedura. Para isso, 2 biorreatores de 1.600.000 L foram considerados, e enquanto um deles estivesse operando, o outro estaria sendo carregado com o caldo fermentescível.

A simulação do biorreator principal foi projetada para o uso de um biorreator encamisado agitado e aerado produzido em aço carbono, equipado com dois agitadores tipo Rushton contendo seis pás planas e posicionados no mesmo eixo. O biorreator selecionado continha ainda quatro chicanas diametralmente opostas (ROSA, 2020).

Os parâmetros cinéticos de conversão usados para a etapa fermentação foram baseados nos estudos de Martinez-Jimenez et al. (2021), exceto a conversão de substrato em xilitol, que foi obtida do estudo de Bonan et al. (2021), e estão apresentados na Tabela 4. É importante destacar que o valor de  $Y_{X/S}$  foi calculado, a partir dos dados experimentais de Martinez-Jimenez et al. (2021) e não a partir do modelo gerado daquele trabalho.

**Tabela 4** – Fatores de conversão utilizados na etapa de fermentação

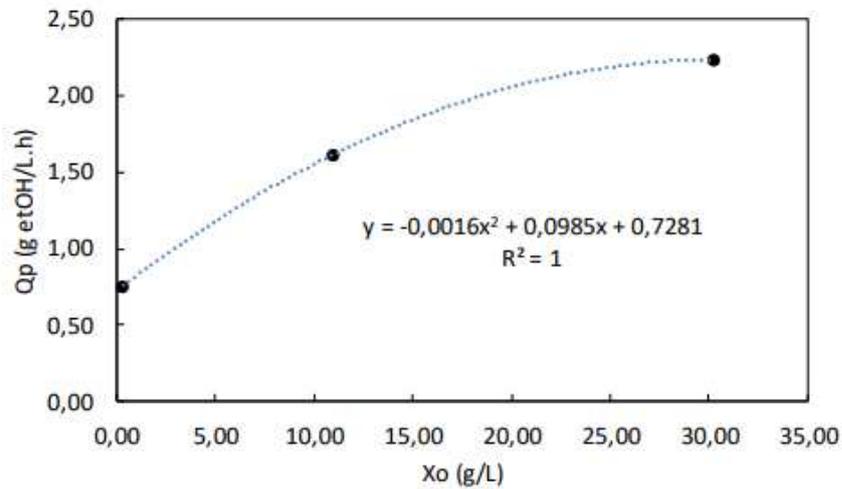
Parâmetro	Valor
Conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ )	0,15 g <sub>cél.</sub> ·g <sub>subs</sub> <sup>-1</sup>
Conversão de substrato em etanol ( $Y_{EtOH/S}$ )	0,38 g <sub>EtOH.</sub> ·g <sub>subs</sub> <sup>-1</sup>
Conversão de substrato em xilitol ( $Y_{xilitol/S}$ )	0,17 g <sub>xil.</sub> ·g <sub>subs</sub> <sup>-1</sup>

**Fonte:** adaptado de Martinez-Jimenez et al. (2021) e Bonan et al. (2021).

Deve-se ressaltar que o microrganismo utilizado consome apenas glicose para o crescimento celular, logo, o  $Y_{X/S}$  foi calculado apenas com base neste substrato. Enquanto a produção de xilitol se dá apenas por meio do consumo de xilose.

O tempo de fermentação foi calculado a partir da equação proposta por Pereira (2020) para a produtividade de etanol (Figura 11).

**Figura 11** - Relação entre a produtividade e a concentração inicial de células nas fermentações em biorreator com a levedura recombinante MP-C5H1 em batelada e meio rico. A linha pontilhada representa o ajuste polinomial dos pontos.



Fonte: Pereira (2020).

No modelo, observa-se um perfil assintótico e é possível verificar que a partir de 30 g/L de concentração celular inicial de leveduras não se nota grandes ganhos em produtividade volumétrica.

#### 4.7 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ) e agitação

A propagação e fermentação aconteceram em aerobiose e microaerofilia, respectivamente. Vale ressaltar que a levedura *S. passalidarum* é *Crabtree* negativa e, portanto, necessita de pequenas quantidades de oxigênio para a produção de etanol e xilitol (Bonan et al., 2021). A determinação do  $k_{LA}$  para os reatores de propagação foi obtida do estudo de Bonan (2018), ou seja,  $k_{LA}$  igual a  $130 \text{ h}^{-1}$ . Enquanto para a fermentação, o dado foi obtido de Martinez-Jimenez et al. (2021), sendo  $k_{LA}$  igual a  $8 \text{ h}^{-1}$ .

Para o escalonamento do processo, foi utilizada a equação (2), baseada na constância de  $k_{LA}$  entre reatores com geometria similar e diferentes capacidades, para obter as condições de agitação.

$$N_2 = N_1 \left( \frac{D_{i2}}{D_{i1}} \right)^{\frac{2B-2,85A}{3,15A}} \left( \frac{Q_2}{Q_1} \right)^{\frac{0,25A-B}{3,15A}} \quad (2)$$

Na qual  $N$  representa a velocidade de rotação em rpm,  $D_i$  o diâmetro do impelidor em metros e  $Q$  a vazão volumétrica de ar em L/min. Para o diâmetro do impelidores foram usadas as dimensões padrão.

#### 4.8 *Downstream*

Todo o material fermentado contendo biomassa, etanol, xilitol e substrato residual seguiu para centrifugação em centrífuga de discos.

Após a centrifugação, a parte líquida resultante seguiu para uma coluna de destilação para obtenção de etanol. Na sequência, a vinhaça rica em xilitol pode ser submetida ao processo de troca iônica para recuperação de xilitol (AFFLECK, 2000 apud SANTOS, 2019).

Já a corrente sólida, seguiu para secador do tipo *spray dryer* para a obtenção de *Single Cell Protein (SCP)*.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de *S. passalidarum* para produção de bioetanol de segunda geração tem potencial de aplicabilidade industrial, uma vez que o H.H. de bagaço de cana-de-açúcar é majoritariamente composto por xilose e glicose, e esta é uma levedura fermentadora de pentose e hexose. Além disso, a levedura também é capaz de produzir xilitol, produto de grande interesse para a indústria de alimentos.

A seguir serão apresentados os dados da simulação da produção de bioetanol e xilitol por *S. passalidarum* a partir de xilose e glicose em larga escala e o fluxograma completo do processo está apresentado na Figura 12.

### 5.1 Pré-tratamento e evaporação para remoção de compostos tóxicos

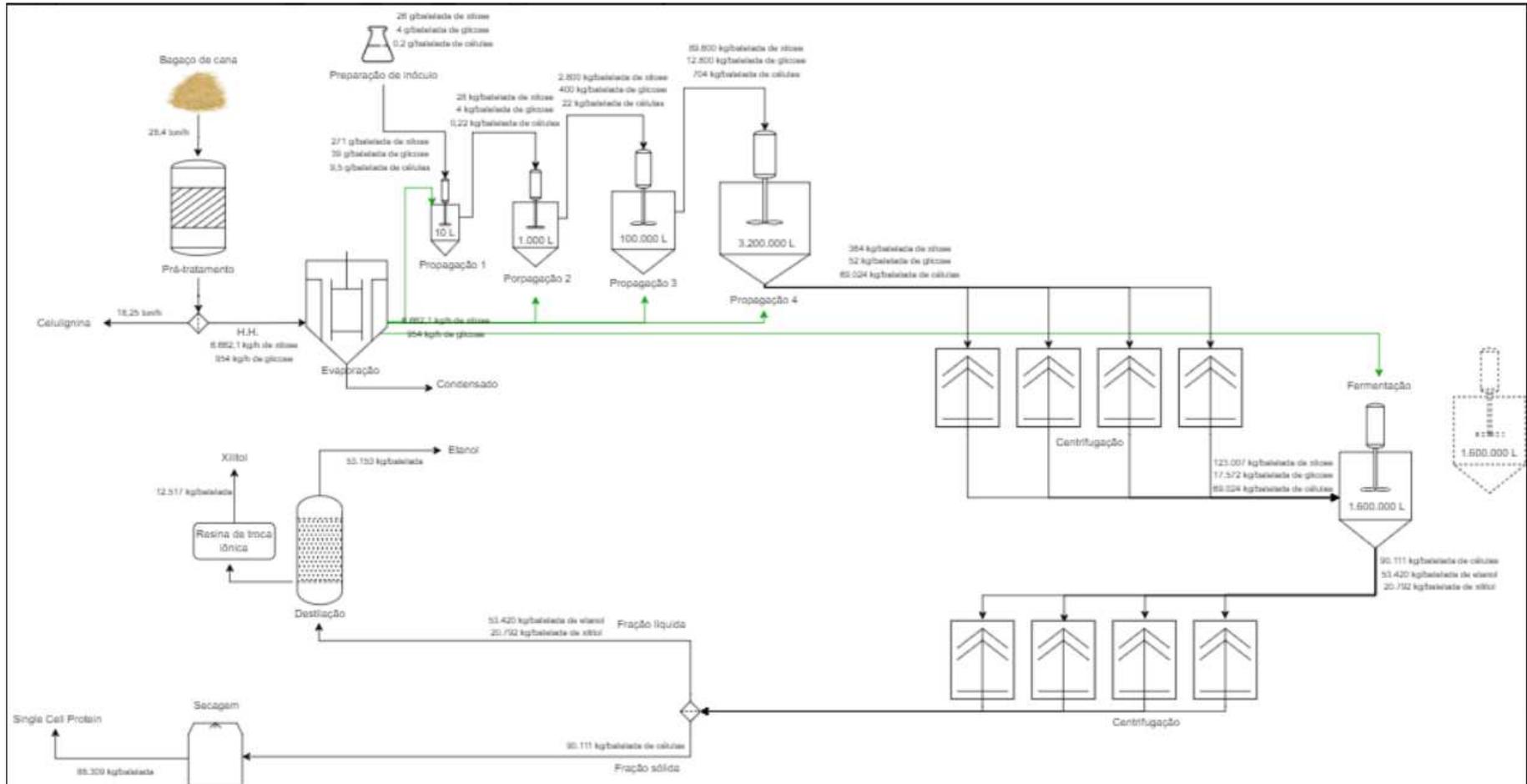
Com base nos dados de Dionísio et al. (2021) e Roque et al. (2019), para pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e evaporação do hidrolisado hemicelulósico, respectivamente, foram realizados cálculos para que obter as correntes de entrada e saída das operações para uma vazão de alimentação de 28,4 ton de bagaço/h (estabelecido conforme trabalho de Klein et al., 2017), a Tabela 5 mostra os resultados obtidos.

**Tabela 5** – Correntes de entrada e saída das operações de pré-tratamento e evaporação

Operação	Entrada (ton/h)	Saída (ton/h)	
Pré-tratamento	28,4 ton/h de bagaço de cana	Celulignina	18,25
		H.H.	10,14
Evaporação	10,14 ton/h de H.H.	Condensado	0,895
		HH Concentrado	9,25

**Fonte:** A autora (2022).

**Figura 12** – Fluxograma completo da produção de etanol de segunda geração, xilitol e SCP (*Single Cell Protein*) por *S. passalidarum*



Fonte: A autora (2022).

Neste sentido, a cada 24 h, a corrente de saída do evaporador, disponibiliza uma quantidade de açúcar de 182.785 kg para ser consumida nas etapas seguintes, conforme os rendimentos apresentados na Tabela 2. Todo o açúcar que sai do pré-tratamento na corrente de hidrolisado hemicelulósico é recuperado na corrente de concentrado após a evaporação (Tabela 6).

**Tabela 6** – Corrente de saída do concentrado somente para os açúcares usados na propagação e fermentação

<b>Componente</b>	<b>Xilose (kg/h)</b>	<b>Arabinose (kg/h)</b>	<b>Glicose (kg/h)</b>
	6.662,1	627,9	954

**Fonte:** A autora (2022).

## 5.2 Produção de inóculo e propagação

Como descrito em Material e Métodos, os dados de produção de inóculo e propagação foram baseados no estudo de Bonan (2018) e adaptados para as condições do presente trabalho.

A produção de inóculo foi feita a partir de um *cryovial* de 4 mL contendo 46 g/L de biomassa. O conteúdo de biomassa foi transferido para um Erlenmeyer de 2 L, com concentração inicial de açúcar redutor (AR) de 15 g/L.

O conteúdo de inóculo foi transferido para o primeiro reator de propagação, após o período de crescimento celular, o caldo foi transferido para o segundo reator, e assim sucessivamente, até o quarto reator de propagação.

A Tabela 7 mostra as concentrações de iniciais e finais para células e AR, e estas foram determinadas com base nos dados de Bonan (2018), considerando os volumes dos reatores de propagação. A concentração inicial de AR foi calculada visando a obtenção de alta densidade celular, conforme estabelecido por Martinez-Jimenez et al. (2021).

**Tabela 7** – Concentrações iniciais e finais de células e AR para cada etapa de preparação de inóculo e propagação

Variável	Inóculo	Prop. 1	Prop. 2	Prop. 3	Prop. 4
X <sub>0</sub> (g/L)	0,09	0,95	0,22	0,22	0,22
X <sub>f</sub> (g/L)	4,73	21,57	21,57	21,57	21,57
S <sub>0</sub> (g/L)	15	31	32	32	32
S <sub>f</sub> (g/L)	0,96	0,22	0,13	0,13	0,13
Tempo (h)	11,9	9,5	14	10,5	14
Volume (L)	2	10	1.000	100.000	3.200.000

Fonte: A autora (2022).

O tempo estimado de crescimento celular foi calculado com base na equação (1), levando em consideração o crescimento celular em fase exponencial ( $\mu_x$  de  $0,33 \text{ h}^{-1}$ ). O tempo total de preparação de inóculo mais propagação foi de 59,9 h, ou seja, 2,5 dias.

O consumo total de açúcar ao final da propagação foi de 105.210 kg, resultando em um total de 42.206 kg de açúcar consumidos por dia. A etapa de propagação mostrou-se longa, necessitando de quatro etapas, sendo a última em um reator de grande volume (3.200.000 L), para que fosse possível atingir a concentração de biomassa suficiente para etapa de fermentação ( $\sim 20 \text{ g/L}$ ).

As correntes de entrada e saída nas etapas de preparação de inóculo e propagação estão representadas na Tabela 8. A corrente de saída da propagação 4 segue para centrifugação para a concentração de AR.

**Tabela 8** – Correntes de entrada e saída nas etapas de preparação de inóculo e propagação

Operação	Entrada (kg/batelada)			Saída (kg/batelada)		
	Xilose	Glicose	Células	Xilose	Glicose	Células
Inóculo	0,026	0,004	0,0002	0,0017	0,0002	0,009
Prop. 1	0,271	0,039	0,0095	0,0019	0,0003	0,2157
Prop. 2	28	4	0,22	0,1138	0,0162	21,57
Prop. 3	2.800	400	22	11,375	1,625	2157
Prop. 4	89.600	12.800	704	364	52	69.024

Fonte: A autora (2022).

Ao final do processo de propagação 69.024 kg de células são produzidos por dia. Os parâmetros de crescimento e rendimento na etapa de propagação foram baseados em um estudo com meio rico e sintéticos, pois nesse processo a propagação com hidrolisado não geraria o mesmo rendimento, tendo em vista a ação de inibidores, por exemplo.

### 5.3 Condições de agitação e aeração para propagação e fermentação

Como citado na seção Material e Métodos, para escalonar o processo foi necessário fazer ajustes nas condições de agitação das etapas de propagação e fermentação para a manutenção do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio. Os valores calculados estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9** – Velocidades de agitação calculadas para cada etapa

	Prop. 1	Prop. 2	Prop. 3	Prop. 4	Fermentação
Volume (L)	10	1.000	100.000	3.200.000	1.600.000
Velocidade de agitação (rpm)	87,8	12,22	1,7	0,38	0,4

**Fonte:** A autora (2022).

Como a equação (2) utilizada para o cálculo das velocidades de agitação depende do diâmetro do impelidor, é possível perceber que quanto maior o volume do reator, menor será sua velocidade de agitação.

### 5.4 Centrifugação

Para centrifugar todo o volume da Propagação 4, ou seja, 3.200.000 L, foram necessárias quatro centrífugas com capacidade individual de 1.600.000 L/h e tempo de transferência de 5 h. Não foram considerados perdas na centrifugação.

As correntes de saída das centrífugas alimentam o biorreator de fermentação.

### 5.5 Fermentação

A produção de bioetanol e xilitol ocorreu em 02 biorreatores agitados e aerados com capacidade de 1.600.000 L com tempo total de 16,3 h e consumo de 140.579 kg de açúcar. Os biorreatores de fermentação operaram de forma alternada durante as bateladas. E considerando o tempo de transferência das centrífugas e o tempo de fermentação, foi possível realizar uma batelada por dia.

As correntes de entrada e saída do fermentador estão apresentadas na Tabela 10.

**Tabela 10** – Correntes de entrada e saída do fermentador

	<b>Entrada</b>	<b>Saída</b>
	<b>(kg/batelada)</b>	<b>(kg/batelada)</b>
Biomassa	69.024	90.111
Xilose	123.007	
Glicose	17.572	0
Etanol	-	53.420
Xilitol	-	20.792

**Fonte:** A autora (2022).

O dimensionamento foi realizado para que todo o açúcar entrando no processo fosse consumido, conforme descrito por Martinez-Jimenez et al., (2021). Considerando que a planta opere durante 330 dias por ano, a produção anual de etanol será de 17,63 mil toneladas, a de xilitol será 6,86 mil toneladas e a de células será 29,74 mil toneladas.

O tempo de fermentação foi calculado com base no modelo obtido por Pereira (2020) para a produtividade de etanol, apresentado previamente em “Material e Métodos. O resultado foi de 16,3 h.

Somando-se os tempos de preparação do inóculo, propagação, centrifugação e fermentação obtemos um tempo total de processo de 81,1 h, antes das etapas de *downstream*.

### 5.6 *Downstream*

O conteúdo resultante da fermentação foi considerado para centrifugação, em centrífugas de disco, para a separação das correntes sólidas e líquidas. O tempo total de operação das centrífugas foi estimado em 2,5 h.

As etapas seguintes à centrifugação foram descritas em “Material e Métodos”.

**Quadro 1** – Equipamentos utilizados para cada etapa de *downstream*

<b>Operação unitária</b>	<b>Equipamento</b>
Centrifugação	Centrífuga de discos
Destilação	Coluna de destilação fracionada
Separação	Resina de troca iônica
Secagem	<i>Spray dryer</i>

**Fonte:** A autora (2022).

Considerou-se eficiência de 99,5 % na recuperação de etanol (SOUZA et al., 2021), de 60,2 % na recuperação de xilitol (WEI et al, 2010 apud ALBUQUERQUE, 2015). Já para a recuperação de células, considerou-se 98 % de eficiência, com isso tem-se os resultados de produção diária na Tabela 11.

**Tabela 11** – Produção diária de etanol, xilitol e células

	<b>Produção (kg/dia)</b>
Células	88.309
Xilitol	12.517
Etanol	53.153

**Fonte:** A autora (2022).

Em um ano, obtém-se a produção de 17,54 mil toneladas de etanol, o equivalente a 22,2 milhões de litros de etanol/ano (considerando-se a densidade do etanol de 789 kg/m<sup>3</sup>), tratando-se de um resultado bastante expressivo.

A nível de comparação, a Raízen S. A., indústria sucroalcooleira de grande relevância no cenário nacional, possui uma planta de etanol de segunda geração com capacidade instalada para a produção de 41 milhões de litros de etanol por ano. Em 2021, a empresa anunciou o investimento em uma nova planta E2G, com o dobro da capacidade instalada da primeira, prevista para começar a operar em 2023 (RAÍZEN, 2021).

Contudo, não é possível avaliar a viabilidade de se produzir etanol de segunda geração por *S. passalidarum* em escala industrial sem que se faça uma avaliação técnico-econômica detalhada do processo, mas, pode-se pontuar algumas questões. Primeiramente, é possível constatar que se trata de um processo bastante complexo e custoso. Além disso, sabe-se que uma grande dificuldade da produção de etanol 2G é o alto custo da biomassa de leveduras, no caso deste processo, esse entrave poderia ser

solucionado com o reciclo de célula. Ainda, o xilitol é um produto de alto valor agregado e sua venda pode gerar lucratividade.

## 6. CONCLUSÃO

A produção de etanol de segunda geração é uma alternativa para suprir a demanda energética mundial, uma vez que utiliza o bagaço de cana-de-açúcar, resíduo da produção de etanol de primeira geração. A partir dos resultados obtidos por meio do escalonamento produção de etanol e xilitol de segunda geração a partir de *S. passalidarum* em uma planta foi possível concluir que:

- Foi possível levantar os dados necessários na literatura, tanto para a composição do bagaço de cana quanto para as correntes de entrada e saída evaporador e, também, os parâmetros cinéticos para produção de células, etanol e xilitol por *S. passalidarum*;
- Foi possível realizar os balanços de massa e escalonar o processo;
- Por meio dos balanços de massas realizados, foi possível identificar as correntes de entrada e saída das operações unitárias, visando obter os dados necessários de matéria-prima para a produção de etanol, xilitol e células;
- A utilização do regime em batelada foi suficiente para o desenvolvimento do processo produtivo, no entanto, sabe-se que a levedura pode ser reutilizada no processo conforme descrito na literatura (Nakanishi et al., 2017) o que poderia reduzir os custos de produção de leveduras;
- Na realização do escalonamento de processos, modificações em relação ao proposto em escala de laboratório foram necessárias para adequar o processo à realidade industrial;
- Por fim, mais estudos devem ser realizados para analisar a viabilidade econômica do processo e o custo energético.

## 7. REFERÊNCIAS

ALBARELLI, J. Q. **Produção de açúcar e etanol de primeira e segunda geração: simulação, integração energética e análise econômica**. 2013. 244 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

ALBUQUERQUE, T. L.; SERAFIM, L. F.; ARCANJO, M. R. A; *et al.* Estudo do processo de purificação do xilitol obtido por rota fermentativa utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. v. 1, n. 2, 2015.

ANDRADE, Leandro Florentino. **Produção de etanol de segunda geração**. 2014. 38 f. Monografia – Pós-graduação em microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

ANDREOLI, Claudinei. Convergência de Agricultura e Energia: I. Produção de biomassa celulósica para biocombustíveis e eletricidade. **Economia & Energia**. Ano XI, No. 66, 2008.

**Annual U.S. & World Fuel Ethanol Production | Renewable Fuels Association**. Renewable Fuels Association. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>>. Acesso em: 19 May 2021.

BENAVIDES, L.S.; OVIEDO, R.J.; LÓPEZ, T.J.D.; MARTÍNEZ, M.A.; VÁSQUEZ, R.A.; HOYOS, S.R.; OROZCO, S.F. Bioprocess plant design and economic analysis of an environmentally friendly insect controller agent produced with *Azadirachta indica* cell culture. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 159, p. 107579-107585, jul. 2020.

BIAZI, L.E.; MARTÍNEZ-JIMENEZ, F.D.; BONAN, C.I.D.G.; *et al.* A differential evolution approach to estimate parameters in a temperature-dependent kinetic model for second generation ethanol production under high cell density with *Spathaspora passalidarum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107586, 2020.

BONAN, Carolina I. D. G. **Avaliação da produção de bioetanol sob diferentes condições de transferência de oxigênio para a levedura *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907**. 2018. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2018.

BONAN, Carolina I. D. G.; TRAMONTINA, Robson; DOS SANTOS, Monick W.; *et al.* Biorefinery Platform for *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 in the Production of Ethanol, Xylitol, and Single Cell Protein from Sugarcane Bagasse. **BioEnergy Research**, 2021.

BUENO, T. **Modelagem, simulação e controle de bioprocessos uma abordagem introdutória**. Curso de Engenharia de Bioprocesso e Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; MOURO, A.; PROMPT, A. H.; GOMES, F. C. O.; STAMBUK, B. U.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Spathaspora brasiliensis sp. nov.*, *Spathaspora suhii sp. nov.*, *Spathaspora roraimanensis sp. nov.* and *Spathaspora xylofermentans sp. nov.*, four novel (D)-xylosefermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 2, p. 421–31, 2013.

CADETE, R.M. & ROSA, C.A.; The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production, **Yeast**; 35: 191–199. 2018.

CINELLI, Bernardo Alves. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. 200 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, mar 2012.

**Conab - Conab estima produção estável de cana e aumento de 32% na de açúcar**. Conab.gov.br. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3568-conab-estima-producao-estavel-de-cana-e-forte-destaque-para-o-acucar-na-safra-atual>>. Acesso em: 19 May 2021.

**Conab - Geadas e estiagem impactam a produção de cana-de-açúcar e derivados no país.** Conab.gov.br. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4377-geadas-e-estiagem-impactam-a-producao-de-cana-de-acucar-e-derivados-no-pais>>. Acesso em: 6 Mar. 2022.

COSTA, Ana Karina Brambilla. **Estudo da fermentação de hidrolisado lignocelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela linhagem *Spathaspora passalidarum* UFMG-HMD 14.1.** 2016. 115 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.

DIONÍSIO, S. R.; SANTORO, D. C. J.; BONAN, C. I. D. G; *et al.* Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse. **Fuel**, 304 (2021) 121290, 2021.

FERREIRA, Juliana. ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO: definição e perspectivas. **Conexão Eletrônica**, v. 12, p. 1-11, 2015.

FERREIRA, M. G. G. **Utilização de modelos para a representação de produtos no projeto conceitual.** PPGEM. UFSC. Florianópolis. 1997. Dissertação.

KLEIN, B. C; SILVA, J. F. L.; JUNQUEIRA, T. L.; *et al.* Process development and techno-economic analysis of bio-based succinic acid derived from pentoses integrated to a sugarcane biorefinery. **Biofuels, Bioprod. Bioref**, 2017.

LIMA, Cleilton Santos; NEITZEL, Thiago; DE OLIVEIRA PEREIRA, Isabela; *et al.* Effect of the Sugarcane Bagasse Deacetylation in the Pentoses Fermentation Process. **BioEnergy Research**, 2021.

LONG, T. M.; SU, Y. K.; HEADMAN, J.; *et al.* Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5492–5500, 2012.

MARTINEZ-JIMENEZ, F.; RIBEIRO, M. P. A.; SARGO, C. R.; et al. Dynamic Modeling Application To Evaluate the Performance of *Spathaspora passalidarum* in Second-Generation Ethanol Production: Parametric Dynamics and the Likelihood Confidence Region. **Ind. Eng. Chem. Res.** 60, 38, 13822–13833, 2021.

MOHD AZHAR, Siti Hajar; ABDULLA, Rahmath; JAMBO, Siti Azmah; et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.

MORAIS, M. S. N. **Modelagem e simulação de um processo fermentativo com sistema de monitoramento via supervisorio**. 62 f. Monografia (Especialização) - Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2019.

NAKANISHI, S. C.; SOARES, L. B.; BIAZI, L. E.; et al. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2211–2221, 2017.

NGUYEN, N. H.; SUH, S.-O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological research**, v. 110, n. Pt 10, p. 1232–41. 2006.

PEREIRA, Isabela de Oliveira. **Aproveitamento da xilose presente na fração hemicelulósica do bagaço de cana de açúcar para estabelecer uma estratégia de produção de etanol**. 2020. 131 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis, 2020.

PEREIRA, Sandra; MAEHARA, Larissa; MACHADO, Cristina; et al. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 44, 2015.

RAÍZEN S. A. - **COMUNICADO AO MERCADO NOVA PLANTA E CONTRATO PARA COMERCIALIZAÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO**. [s.l.: s.n., s.d.]. Disponível em: <<https://api.mziq.com/mzfilemanager/v2/d/c016735f-1711-48ce-919f-a8c701b83c19/deed5509-6ae2-31f9-2f4e-51a3e7cbaddf?origin=1>>. Acesso em: 17 Mar. 2022.

ROQUE, Laerti Reis; MORGADO, Grazielle Patrícia; NASCIMENTO, Viviane Marcos; *et al.* Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. **Fuel**, v. 242, p. 775–787, 2019.

ROSA, Silvia Salvan da. **Produção de pigmento vermelho *Monascus ruber* em escala piloto: projeto conceitual e especificações de processo**. 2020. 59 f. Trabalho de conclusão de curso – Curso de Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis, 2020.

SANTOS, Monick Webber dos. **Avaliação da produção de xilitol por *Spathaspora passalidarum***. 2019. 47 f. Trabalho de conclusão de curso – Curso de Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis, 2019.

SOUZA, A. E. C; CERQUEIRA, D. A.; SOUSA, N. G.; *et al.* Simulação do processo de destilação extrativa para produção de etanol anidro utilizando etilenoglicol como agente de separação. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, e45610414228, 2021.

VASCONCELOS, S. M.; SANTOS, A. M. P.; ROCHA, G. J. M; *et al.* Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v 135, 46-52, 2013.

XU, Yirong; CHI, Ping; BILAL, Muhammad; *et al.* Biosynthetic strategies to produce xylitol: an economical venture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 13, p. 5143–5160, 2019.

ZÚÑIGA, Ursula Fabiola Rodríguez. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 2010. 228 f. Tese (Doutorado) – Curso de Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.