



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
TESE DE DOUTORADO

PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO A PARTIR DE *Arundo donax* L.

JULIANA SILVA LEMÕES

Porto Alegre, novembro 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JULIANA SILVA LEMÕES

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE *Arundo
donax* L.**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau
de doutor em Química

Profa. Dra. Maria do Carmo Ruaro Peralba

Porto Alegre, novembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jorge e Maria Eulália, pelo amor incondicional e pelo apoio em todas as fases da minha vida. À vó Jozephina, minha segunda mãe.

Aos meus irmãos Davi e Lucas, em especial ao Lucas pela disponibilidade e companhia no laboratório.

Ao Paulo pela compreensão e paciência, pelo constante incentivo, apoio e dedicação.

Aos meus dindos e tios, Sérgio e Claudia, que sempre me inspiraram e orientaram profissionalmente.

À Prof. Maria do Carmo Ruaro Peralba pela orientação na realização deste trabalho.

Aos colegas do Grupo de Agroenergia da Embrapa Clima Temperado em especial aos alunos de iniciação científica Amanda Valente, Kauana Cardoso, Patrícia Nunes, Milena Moreira, Karen Bes, Vitória Azevedo, Camila Fávero, Carla Katrein da Costa, Carolina Korzenieski e Bettina Machado pelo auxílio na realização deste trabalho. À Sabrina Peres Farias Ávila, pela colaboração na realização deste trabalho e pela amizade.

À Cândida Montero pela amizade e por sempre estar disposta a ajudar.

Às equipes do Laboratório de Cultura de Tecidos, Biologia Molecular e Central Analítica da Embrapa Clima Temperado.

À Nicole Sehnem pelo auxílio nas análises cromatográficas na fase inicial deste trabalho.

Aos professores Dimitrios Samios, Tânia Mara Pizzolato e Fátima Menezes Bento pelas considerações feitas no exame de qualificação.

A Novozymes pela doação da enzima. Ao CNPq e Capes pelo apoio financeiro.

TRABALHOS GERADOS A PARTIR DESTA TESE

Artigos completos publicados em periódicos

Lemões, J. S.; Lemons e Silva, C. F.; Avila, S. P. F.; Montero, C. R. S.; Silva, S. D. A.; Samios, D.; Peralba, M. C. R. Chemical pretreatment of Arundo donax L. for second-generation ethanol production. *Electron J Biotechn.* **2018**, *31*, 67. ISSN: 0717-3458; Impact Factor: 1.527

Azevedo, V. Q.; Lemons e Silva, C. F.; Lemões, J. S.; Farias, S. P. Caracterização de biomassa visando à produção de etanol de segunda geração. *Revista Brasileira de Engenharia e Sustentabilidade*, v. 2, p. 61-65, 2016. ISSN: 2448-1661

Bes, K.; Lemões, J. S.; Lemons e Silva, C. F.; Silva, S. D. A. Extração e caracterização da lignina proveniente do pré-tratamento de biomassa para produção de etanol de 2ª geração. *Engenharia Sanitária e Ambiental (aceito para publicação)*. ISSN: 1809-4457

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

Bes, K.; Favero, C.; Lemões, J. S.; Lemons e Silva, C. F. Análise de diferentes métodos de extração de lignina residual do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. In: V Simpósio Internacional Sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais, 2017, Foz do Iguaçu.

Lemões, J. S.; Farias, S. P.; Lemons e Silva, C. F.; Peralba, M. C. R.; Silva, Sérgio Delmar dos Anjos e. Efeito da concentração de H₂SO₄ e do tempo no pré-tratamento de Arundo donax L. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos. XI Simpósio de Hidrólise Enzimática De Biomassa, 2015, Fortaleza.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

Lemões, J. S.; Farias, S. P.; Lemons e Silva, C. F.; Peres, M. M.; Peralba, M. C. R. Pré-tratamento químico de biomassa de Arundo donax L. visando a produção de etanol de segunda geração. In: Simpósio Estadual de Agroenergia, 2014, Pelotas.

Farias, S. P.; Lemões, Juliana S.; Lemons e Silva, C. F.; Messias, R.; Ruiz, W. A. Perda de massa de casca de arroz, palha de arroz e Arundo donax L. submetidos à pré-tratamento químico. In: Simpósio Estadual de Agroenergia, 2014, Pelotas.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos)

Lemões, Juliana Silva; Lemons e Silva, C. F.; Peralba, M. C. R.; Silva, S. D. A. e. . Rendimento de etanol obtidos a partir de diferentes pré-tratamentos de arundo. In: VI Reunião Técnica de Agroenergia - Especial Cana-de-Açúcar e o IX Simpósio de Energia e Meio Ambiente - Valorização Energética de Resíduos, 2017, Pelotas.

Lemões, Juliana Silva; Lemons e Silva, C. F.; Avila, S. P. F. ; Costa, C. K. ; Favero, C.; Peralba, M. C. R.; Silva, S. D. A. e. . Efeito da carga enzimática na concentração de açúcares na hidrólise de Arundo donax L.. In: VI Reunião Técnica de Agroenergia - Especial Cana-de-Açúcar e o IX Simpósio de Energia e Meio Ambiente - Valorização Energética de Resíduos, 2017.

Lemões, Juliana Silva; Lemons e Silva, C. F.; Bes, K. ; Azevedo, V. Q.; Korzenieski, C. P.; Peralba, M. C. R.; Silva, S. D. A. e. Efeito da concentração de NaOH no pré-tratamento químico de arundo. In: VI Reunião Técnica de Agroenergia - Especial Cana-de-Açúcar e o IX Simpósio de Energia e Meio Ambiente - Valorização Energética de Resíduos, 2017, Pelotas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVOS GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 PRODUÇÃO DE ETANOL.....	5
3.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	9
3.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	14
3.3.1 Pré-tratamento	14
3.3.2 Hidrólise Enzimática	18
3.3.3 Fermentação.....	20
3.4 ARUNDO DONAX L.	25
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	30
4.1 COLETA, SECAGEM E PREPARO DA BIOMASSA	30
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA	30
4.2.1 Análise Granulométrica.....	30
4.2.2 Determinação da Umidade	30
4.2.3 Determinação de Extrativos.....	31
4.2.4 Determinação de Carboidratos Estruturais e Lignina.....	31
4.3 PRÉ-TRATAMENTO	33
4.3.1 Pré-tratamento ácido.....	34
4.3.2Pré-tratamento alcalino.....	35
4.3.3 Hidrólise Enzimática	36
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	37
4.4.1 Atividade enzimática em papel filtro.....	37
4.4.2 Atividade enzimática CMCásica	37
4.4.3 Atividade enzimática β -glucosidásica	38
4.5 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	38
4.6 FERMENTAÇÕES	39
4.6.1 Hidrólise e fermentação separadas (SHF)	39
4.6.2 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).....	40
4.6.3 Cálculos de Rendimentos de Fermentações	41

4.7 ANÁLISE DOS PRODUTOS POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	42
4.7.1 Análise de açúcares, ácido acético e etanol	42
4.7.2 Análise de 5 - hidroximetilfurfural e furfural	42
4.7.3 Determinação dos limites de detecção e quantificação	42
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA	44
5.2 PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO	46
5.2.1 Pré-tratamento ácido.....	46
5.2.2 Pré-tratamento alcalino.....	65
5.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	72
5.4 FERMENTAÇÃO	76
5.4.1 Processo SHF.....	76
5.4.2 Processo SSF	81
5.4.3 Comparação entre SHF e SSF e considerações	87
6. CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da celulose. ⁷	10
Figura 2. Moléculas de açúcares que podem ser encontradas nas cadeias de hemicelulose.	11
Figura 3. Estrutura de hemicelulose.	11
Figura 4. Núcleos fenólicos encontrados na lignina. ⁷	12
Figura 5. Unidades precursoras monoméricas da lignina. ⁷	13
Figura 6. Principais ligações identificadas em ligninas. ³⁵	13
Figura 7. Estrutura química da lignina. ⁷	13
Figura 8. Principais etapas do processo de produção de etanol de segunda geração. ...	14
Figura 9. Representação da estrutura lignocelulósica da parede celular de plantas. ¹	15
Figura 10. Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido. ²⁰	16
Figura 11. Representação esquemática da desconstrução enzimática de celulose. ³⁰	19
Figura 12. Estratégias de fermentação para produção de etanol de segunda geração. ⁵ 23	
Figura 13. Plantas de <i>Arundo donax</i> L. cultivadas na Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS.	26
Figura 14. Fluxograma do processo de pré-tratamento químico da biomassa de arundo.	33
Figura 15. Biomassa de arundo coletada no município de Pelotas/RS após secagem (A) e após moagem em moinho de facas (B).	44
Figura 16. Superfície de resposta para concentração de glicose (g L^{-1}) em função da concentração de H_2SO_4 e do tempo (A) e superfície de resposta para concentração de glicose (g L^{-1}) em função da concentração de H_2SO_4 e da relação sólido:líquido (B)...	48
Figura 17. Superfície de resposta para concentração de glicose (g L^{-1}) no pré-hidrolisado, em função da relação sólido:líquido e do tempo.	49
Figura 18. Superfície de resposta para concentração de xilose (g L^{-1}) em função da concentração de H_2SO_4 e do tempo (A) e superfície de resposta para concentração de xilose (g L^{-1}) em função da concentração de H_2SO_4 e da relação sólido:líquido (B).....	51
Figura 19. Superfície de resposta para concentração de xilose (g L^{-1}) em função da relação sólido:líquido e do tempo.	51
Figura 20. Superfície de resposta para concentração de glicose (g L^{-1}) em função da concentração de ácido sulfúrico e do tempo.	57

Figura 21. Superfície de resposta para concentração de glicose (g L^{-1}) em função da relação sólido:líquido e da concentração de ácido sulfúrico.	58
Figura 22. Superfície de resposta para concentração de xilose (g L^{-1}) em função da concentração de ácido sulfúrico e do tempo.	59
Figura 23. Superfície de resposta para concentração de xilose (g L^{-1}) em função da concentração de ácido sulfúrico e da relação sólido:líquido.	60
Figura 24. Superfície de resposta para concentração de xilose (g L^{-1}) em função da relação sólido:líquido e do tempo.	60
Figura 25. Biomassa sem pré-tratamento (A), biomassa após tratamento ácido (B) e biomassa após tratamento ácido seguido de alcalino (C).	63
Figura 26. Concentração de glicose na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada em três diferentes condições: pré-tratamento ácido seguido de alcalino (●); pré-tratamento com água seguido de alcalino (▲) e pré-tratamento alcalino (■).	64
Figura 27. Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para concentração de glicose em função das variáveis concentração de hidróxido de sódio e relação sólido:líquido no pré-tratamento alcalino de arundo.	67
Figura 28. Superfície de resposta para concentração de xilose em função das variáveis concentração de hidróxido de sódio e relação sólido:líquido no pré-tratamento alcalino de arundo.	69
Figura 29. Concentrações de glicose (●), xilose (▲) e celobiose (■) na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada com hidróxido de sódio.	71
Figura 30. Superfície de resposta para concentração de glicose na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada com hidróxido de sódio.	75
Figura 31. Superfície de resposta para concentração de xilose na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada com hidróxido de sódio.	75
Figura 32. Perfil de consumo de glicose (●) e produção de etanol (■) na fermentação através do processo SHF de hidrolisado de biomassa de arundo obtido por hidrólise com carga enzimática de 15 FPU g^{-1} e relação sólido:líquido $1:10 \text{ g mL}^{-1}$	77
Figura 33. Perfil de consumo de glicose (●) e produção de etanol (■) na fermentação através do processo SHF de hidrolisado de biomassa de arundo obtido por hidrólise com carga enzimática de 20 FPU g^{-1} e relação sólido:líquido $1:13 \text{ g mL}^{-1}$	77
Figura 34. Perfil de consumo de glicose (●) e produção de etanol (■) na fermentação através do processo SHF de hidrolisado de biomassa de arundo obtido por hidrólise com carga enzimática de 50 FPU g^{-1} e relação sólido:líquido $1:5,8 \text{ g mL}^{-1}$	78

Figura 35. Perfil de consumo de glicose(■) e produção de etanol (◆) na fermentação através do processo SSF de biomassa de arundo com carga enzimática de 20 FPU g⁻¹ na pré-hidrólise e carga de sólidos de 160 g L⁻¹..... 82

Figura 36. Perfil de consumo de glicose (■) e produção de etanol (◆) na fermentação através do processo SSF de biomassa de arundo com carga enzimática de 25 FPU g⁻¹ na pré-hidrólise e carga de sólidos de 200 g L⁻¹..... 83

Figura 37. Perfil de consumo de glicose(■) e produção de etanol (◆) na fermentação através do processo SSF de biomassa de arundo com carga enzimática de 50 FPU g⁻¹ na pré-hidrólise e carga de sólidos de 320 g L⁻¹..... 84

Figura 38. Concentração média de xilose durante o processo de fermentação dos hidrolisados de biomassa de arundo pré-tratada. SHF 1 (●), SHF 2 (▲) e SHF 3 (■). . 89

Figura 39. Concentração de xilose durante o processo de fermentação da biomassa de arundo pré-tratada. SSF 1 (●), SSF 2 (▲) e SSF 3 (■). 90

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Usinas de etanol de segunda geração com produção em escala comercial.^{21,23,24} 7

Tabela II. Usinas em escala de demonstração, biomassas utilizadas e capacidade (T ano⁻¹).²⁵ 8

Tabela III. Usinas em escala piloto, biomassas utilizadas e capacidade (T ano⁻¹).²⁵ 9

Tabela IV. Matriz do planejamento experimental e valores experimentais das variáveis concentração de ácido sulfúrico (% v v⁻¹), tempo (minutos) e relação sólido (S):líquido (L) (g mL⁻¹) no pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L. 35

Tabela V. Matriz do planejamento experimental e valores experimentais das variáveis concentração de hidróxido de sódio (mol L⁻¹) e relação sólido (S):líquido (L) (g mL⁻¹) no pré-tratamento alcalino de *Arundo donax* L. 36

Tabela VI. Matriz do planejamento experimental e valores experimentais da hidrólise enzimática de *Arundo donax* L. 39

Tabela VII. Massa inicial, carga enzimática na pré-hidrólise e carga de sólidos na fermentação de biomassa pré-tratada de arundo..... 40

Tabela VIII. Análise granulométrica da biomassa de *Arundo donax* L. 45

Tabela IX. Composição química da biomassa de *Arundo donax* L. 45

Tabela X. Valores experimentais e variáveis resposta concentração de glicose, xilose e somatório obtidos no pré-hidrolisado do planejamento experimental do pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L..... 47

Tabela XI. Estimativa dos efeitos para concentração de glicose obtidos no pré-hidrolisado do planejamento experimental do pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L. 48

Tabela XII. Estimativa dos efeitos para concentração de xilose obtidos no pré-hidrolisado do planejamento experimental do pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L. 50

Tabela XIII. Valores experimentais, perda de massa e variáveis resposta concentração de glicose, xilose e somatório obtidos no planejamento experimental do pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L..... 52

Tabela XIV. Concentrações de 5-hidroximetilfurfural (HMF), furfural e ácido acético obtidos na hidrólise enzimática da biomassa após pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L. 54

Tabela XV. Valores experimentais, perda de massa (% m m ⁻¹) e variáveis resposta concentração de glicose, xilose, celobiose, HMF e furfural obtidos no planejamento experimental do pré-tratamento ácido seguido de pré-tratamento alcalino de <i>Arundo donax</i> L.	55
Tabela XVI. Estimativa dos efeitos para concentração de glicose obtidos na hidrólise da biomassa após o pré-tratamento ácido seguido de pré-tratamento alcalino de <i>Arundo donax</i> L.	57
Tabela XVII. Estimativa dos efeitos para concentração de xilose obtidos na hidrólise da biomassa após o pré-tratamento ácido seguido de pré-tratamento alcalino de <i>Arundo donax</i> L.	59
Tabela XVIII. Concentrações de glicose, xilose, HMF e furfural nos hidrolisados obtidos da biomassa pré-tratada.	61
Tabela XIX. Composição química das biomassas após pré-tratamento de <i>Arundo</i>	62
Tabela XX. Concentração de etanol obtida na fermentação de hidrolisados de arundo, rendimento de etanol por massa de arundo e estimativa de rendimento por área plantada.	65
Tabela XXI. Valores experimentais e variáveis resposta concentração de glicose, xilose e celobiose obtidos no planejamento experimental do pré-tratamento alcalino de <i>Arundo donax</i> L.	66
Tabela XXII. Estimativa dos efeitos para concentração de glicose obtidos no pré-tratamento alcalino de <i>Arundo donax</i> L.	67
Tabela XXIII. Estimativa dos efeitos para concentração de xilose obtidos no pré-tratamento alcalino de <i>Arundo donax</i> L.	68
Tabela XXIV. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão do pré-tratamento alcalino para concentrações de glicose e xilose.	69
Tabela XXV. Valores experimentais concentração de ácido acético, HMF e furfural obtidos no planejamento experimental do pré-tratamento alcalino de <i>Arundo donax</i> L.	70
Tabela XXVI. Concentração de HMF, furfural e ácido acético após 48 horas de hidrólise da biomassa obtida no pré-tratamento alcalino de <i>Arundo donax</i> L.	72
Tabela XXVII. Concentrações de glicose e xilose e eficiências de hidrólise enzimática de <i>Arundo donax</i> L.	73
Tabela XXVIII. Estimativa dos efeitos para concentração de glicose obtidos na hidrólise enzimática de <i>Arundo donax</i> L.	74

Tabela XXIX. Estimativa dos efeitos para concentração de xilose obtidos na hidrólise enzimática de <i>Arundo donax</i> L.	74
Tabela XXX. Concentração de glicose e etanol (g L^{-1}) e rendimentos obtidos na fermentação de hidrolisados de <i>Arundo donax</i> L.	79
Tabela XXXI. Concentração e produtividade volumétrica de etanol obtidos de diferentes biomassas por diferentes autores e biomassa de arundo no presente trabalho.	81
Tabela XXXII. Concentração de glicose e etanol (g L^{-1}) e rendimentos de etanol obtidos na fermentação da biomassa de <i>Arundo donax</i> L.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviação/Sigla	Nome por extenso
1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
CBP	Bioprocesso consolidado
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
ECC	Eficiência de conversão de celulose a etanol
E.F	Eficiência de fermentação
FPU	Unidades de papel filtro
HMF	5-Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia a líquido de alto desempenho
IR	Detector de índice de refração
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MSR	Metodologia de superfície de resposta
NSSF	Sacarificação e fermentação simultâneas não isotérmicas
PSSF	Pré-hidrólise e sacarificação e fermentação simultâneas
Q _P	Produtividade volumétrica em etanol
RPS	Redução percentual de substrato
SHF	Hidrólise e fermentação separadas
SSCF	Sacarificação e co-fermentação simultânea
SSF	Sacarificação e fermentação simultânea
SSSF	Sacarificação e fermentação semi-simultâneas
Y _{P/S}	Fator de rendimento de produção de etanol

RESUMO

A crescente demanda energética traz a necessidade de desenvolvimento de novos combustíveis renováveis, visando à menor emissão de partículas e poluentes ao meio ambiente e a substituição dos derivados de petróleo. Atualmente, pesquisas com a utilização de biomassa lignocelulósica vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de tornar o processo de produção de etanol de segunda geração economicamente viável. O arundo (*Arundo donax* L.) é uma gramínea de crescimento rápido, alto rendimento de biomassa e pode ser cultivada em áreas marginais, que em função de características de cultivo, crescimento e produtividade apresenta potencial para produção de etanol de segunda geração. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer as melhores condições de pré-tratamento, hidrólise e fermentação da biomassa de *Arundo donax* L. visando à produção de etanol. Três pré-tratamentos foram testados: pré-tratamento ácido, pré-tratamento ácido seguido de pré-tratamento alcalino e pré-tratamento alcalino. Foram avaliadas variáveis de cada pré-tratamento utilizando planejamento composto central rotacional através da metodologia de superfície de resposta. Após a otimização das condições de pré-tratamento, foram avaliadas as variáveis carga enzimática e relação sólido:líquido nos rendimentos de glicose e xilose na hidrólise enzimática. Por fim, foram avaliadas condições de fermentação dos hidrolisados obtidos na hidrólise enzimática e fermentação e hidrólise simultâneas da biomassa pré-tratada. No pré-tratamento da biomassa as concentrações de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada, apenas com ácido sulfúrico, variaram de 6,2 a 19,1 g L⁻¹ e 1,8 a 3,1 g L⁻¹, respectivamente. A adição de pré-tratamento alcalino possibilitou aumento significativo da concentração de açúcares liberados. O uso apenas de pré-tratamento alcalino resultou em concentrações de glicose e xilose que não diferiram estatisticamente dos obtidos com pré-tratamento em duas etapas. As concentrações de 5-hidroximetilfurfural e furfural não diferiram significativamente entre os pré-tratamentos testados. Na hidrólise enzimática apenas a relação sólido:líquido apresentou efeito significativo nas concentrações de glicose e xilose. Os rendimentos de etanol obtidos pelo processo de sacarificação e fermentação simultâneas foram superiores aos obtidos quando a hidrólise e fermentação foram conduzidas em etapas separadas. Os maiores rendimentos de etanol foram obtidos com carga de sólidos de 200 g L⁻¹, e 25 FPU g⁻¹ na etapa de pré-hidrólise.

ABSTRACT

The growing energy demand brings the need for development of new renewable fuels, aiming to reduce emission of particles and pollutants into the environment as well as substitution of petroleum products. Nowadays, researches using lignocellulosic biomass have been developed with the objective of making the production process of second generation ethanol economically viable. *Arundo donax L.*, is a perennial grass presenting high biomass production and ability of growing in different environments, which due to the cultivation characteristics, growth and productivity presents potential as raw material for production of second generation ethanol. The present work envisages to establish the best pre-treatment hydrolysis and fermentation conditions for the biomass of *Arundo donax L.* aiming to ethanol production. Three pretreatments were tested: acid pretreatment, acid pretreatment followed by alkaline pretreatment and alkaline pretreatment. Variables of each pretreatment were evaluated using central rotational composite design through response surface methodology. After optimization of the pretreatment conditions, the influence of enzymatic loading and solid-to-liquid ratio variables in the glucose and xylose yields by the enzymatic hydrolysis were evaluated. Finally, the fermentation conditions of the hydrolysates obtained in the enzymatic hydrolysis and simultaneous fermentation and hydrolysis of the pretreated biomass were evaluated. The amounts of glucose and xylose released by enzymatic hydrolysis of the *Arundo* biomass obtained from acid pretreatment ranged from 6.2 to 19.1 g/L and 1.8 to 3.1 g/L, respectively. The addition of an alkaline pretreatment led to a higher yield from the enzymatic hydrolysis with the average glucose concentration 3.5 times that obtained after biomass hydrolysis with an acid pretreatment exclusively. The use of an alkaline pretreatment alone resulted in glucose and xylose concentrations similar to those obtained in the two-step pretreatment: acid pretreatment followed by alkaline pretreatment. There was no significant difference in 5-hydroxymethylfurfural, furfural or acetic acid concentration among the pretreatments. In the enzymatic hydrolysis, only a solid-to- liquid ratio showed a significant effect on glucose and xylose concentrations. The ethanol yields obtained by the simultaneous hydrolysis and fermentation process are higher than those obtained when the hydrolysis and fermentation were conducted in separate steps. The highest ethanol yields were obtained with solids loading of 200 g L⁻¹, and 25 FPU g⁻¹ in the prehydrolysis step.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A demanda energética crescente tem aumentado o interesse de diversos países no desenvolvimento de tecnologias que possam substituir os derivados de petróleo, visando a menor emissão de partículas e poluentes ao meio ambiente e a dependência de uma fonte finita de matéria-prima.^{1,2,3}

No Brasil, dois biocombustíveis líquidos são produzidos em grande escala, o biodiesel, produzido através da conversão química de óleos e gorduras em ésteres alquílicos de ácidos graxos e o bioetanol produzido a partir do caldo de cana-de-açúcar.⁴

O etanol pode ser produzido utilizando diferentes matérias-primas, como as sacarídeas (caldo de cana-de-açúcar e beterraba), as amiláceas (amido de milho, arroz, batata, entre outros) e lignocelulósicas (plantas e resíduos lignocelulósicos).^{1,5}

O Brasil é o segundo produtor mundial de etanole possui tecnologia consolidada sendo líder mundial na produção de cana-de-açúcar. Porém ainda é necessário o desenvolvimento e adequação de processos utilizando matérias primas alternativas à cana-de-açúcar para produção de etanol com o objetivo de elevar rendimentos e a produtividade global do processo.^{6,7}

O tipo de matéria-prima e a tecnologia utilizada para produção permitem a classificação dos biocombustíveis em processos de primeira e segunda geração. Biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de matérias primas também utilizadas para a alimentação tais como açúcares, amido e óleos vegetais usando tecnologias convencionais. Já os biocombustíveis de segunda geração são obtidos de matérias primas alternativas como biomassa e resíduos lignocelulósicos além de óleos e gorduras não comestíveis, através de novas tecnologias desenvolvidas em função das características das matérias primas utilizadas.^{1,3,8}

A produção de etanol de segunda geração utilizando biomassas lignocelulósicas apresenta-se como uma alternativa promissora para suprir a demanda mundial por biocombustíveis, em função da alta disponibilidade e baixo custo de matéria-prima.^{3,6,7}

A principal diferença no processo de produção de etanol de segunda geração é a etapa de pré-tratamento, a qual visa a adequação da biomassa às etapas de hidrólise e fermentação, sendo essencial para o alcance de altos rendimentos de etanol.^{3,6,7} Dependendo das características da biomassa, o pré-tratamento pode ser a etapa de maior custo do processo de produção.⁹

Desta forma, pesquisas com a utilização de biomassa lignocelulósica vêm sendo cada vez mais desenvolvidas, com o objetivo de tornar o processo de produção de etanol de segunda geração economicamente viável.⁶

O arundo (*Arundo donax* L.) é uma gramínea pertencente à família Poaceae que apresenta crescimento rápido, alto rendimento de biomassa, cresce em ambientes alagados e pode ser cultivada em áreas marginais. Em função de características de cultivo, crescimento e produtividade, a cultura do arundo apresenta significativo potencial para produção de etanol de segunda geração.^{10,11,12, 13}

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAL

Estabeleceras melhores condições de pré-tratamento, hidrólise e fermentação da biomassa de *Arundo donax* L. visando à produção de etanol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a matéria-prima quanto à composição química da biomassa (celulose, hemicelulose, lignina, extrativos, cinzas e umidade).
- Testar e otimizar condições de pré-tratamento ácido diluído da biomassa avaliando as variáveis concentração de ácido sulfúrico, tempo e relação sólido:líquido.
- Testar e otimizar condições de pré-tratamento alcalino da biomassa avaliando as variáveis concentração hidróxido de sódio e relação sólido:líquido
- Selecionar as melhores condições de pré-tratamento com base nos teores de glicose e xilose liberados na hidrólise enzimática.
- Testar e otimizar as condições de hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada avaliando as variáveis carga enzimática e relação sólido:líquido.
- Submeter a biomassa pré-tratada aos processos de sacarificação seguida de fermentação (HSF) e ao processo de sacarificação e fermentação simultâneos (SSF).
- Acompanhar a formação de produtos indesejáveis ao processo (ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural) por cromatografia a líquido de alta eficiência.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO DE ETANOL

Estados Unidos e Brasil são os principais produtores mundial de etanol, responsáveis por mais de 80% do volume total produzido. Nos dois países, as principais matérias-primas utilizadas são o milho e a cana-de-açúcar, respectivamente, sendo os processos de produção classificados como de primeira geração, já que utilizam matérias-primas também destinadas à alimentação.^{14,15}

No Brasil há registros de uso de etanol como combustível veicular anteriores à Segunda Guerra Mundial. Em 1975 foi lançado o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), que inicialmente teve objetivo de produzir etanol anidro para misturar à gasolina e assim, diminuir a dependência externa de combustíveis do país e desenvolver a indústria da cana-de-açúcar e álcool. Com o sucesso do Proálcool, a indústria automobilística passou a produzir veículos movidos a etanol hidratado exclusivamente ou em mistura com a gasolina.^{14,15,16}

Após período de aumento da produção alcooleira em meados dos anos 1980, o governo começou a diminuir incentivos ao Proálcool em função da estabilidade do preço do petróleo, da ascensão no mercado de açúcar e da crise econômica do país. O governo interrompeu financiamentos e subsídios a novas destilarias e o setor passou por período de estagnação, sendo que o Programa foi finalizado em 1990.^{14,16,17,18}

No início dos anos 2000 a indústria automobilística brasileira lançou os veículos com tecnologia *Flex-fuel*, que podem utilizar etanol hidratado e gasolina, puros ou misturados em diferentes proporções, o que proporcionou um aumento do uso de etanol como combustível no país. No Brasil, atualmente, é adicionado 27% de etanol anidro à gasolina comercializada como combustível.¹⁸

Com a entrada de veículos *Flex-fuel* no mercado brasileiro, a proibição do uso de aditivos na gasolina como o metil-terc-butil éter (MTBE) pelos Estados Unidos e União Europeia, e a demanda por combustíveis limpos, fez com que o setor sucroenergético passasse a investir na ampliação da capacidade produtiva. Porém com a crise internacional em 2008, o setor foi drasticamente afetado sendo registrado o fechamento de diversas usinas no Brasil.¹⁸

Em 2016 foi lançado o Programa RenovaBio (Política Nacional de Biocombustíveis) que tem como principal objetivo estimular a produção de biocombustíveis (etanol, o biodiesel, o biogás e bioquerosene de aviação) no país.

Outros objetivos do Programa incluem garantir a previsibilidade dos biocombustíveis no mercado de combustíveis, a geração de investimentos e empregos no setor, e a competitividade brasileira no mercado internacional de biocombustíveis, além de impulsionar o desenvolvimento e a inovação para aumentar a competitividade dos biocombustíveis e a inserção de combustíveis avançados e novos biocombustíveis. Dentro do Programa estão previstos instrumentos como créditos de descarbonização, certificação de biocombustíveis, adições de biocombustíveis aos combustíveis fósseis, incentivos fiscais e financeiros. Porém, o Programa ainda não foi lançado oficialmente pelo Governo Federal.¹⁹

Entre as diretrizes estratégicas aprovadas pelo Conselho Nacional de Política Energética, em 8 de junho de 2017, está a criação de mecanismos para impulsionar o potencial brasileiro na produção competitiva de etanol celulósico.¹⁹

A produção de biocombustíveis de segunda geração tem sido incentivada em diferentes países, com o objetivo de mitigar problemas ambientais amplamente discutidos nas últimas décadas e aumentar a produção e oferta do biocombustível, aumentando a sustentabilidade da cadeia produtiva.^{14,20}

Os biocombustíveis de segunda geração apresentam diversas vantagens em relação aos de primeira geração, como o uso de matérias-primas de baixo custo que não sejam destinadas à alimentação e que contribuam para a redução da emissão de gases de efeito estufa. Porém, o processo de produção de biocombustíveis de segunda geração (2G) envolve significativas mudanças técnicas e econômicas em relação ao processo de primeira geração (1G).^{2,21,22}

Na produção de etanol de segunda geração, estas diferenças são consequência das características da biomassa lignocelulósica, composição e recalcitrância, que torna necessário o processo de pré-tratamento. Além disso, comparado aos processos 1G, o custo das enzimas celulolíticas, a presença de diferentes açúcares oriundos da hemicelulose (principalmente composta por pentoses), a baixa concentração de açúcares liberados da biomassa (em relação às biomassas utilizadas nos processos 1G, como caldo de cana-de-açúcar e amido de milho) e a presença de compostos inibidores das etapas de hidrólise e fermentação devem ser considerados para a adequação e viabilidade do processo.²¹

O etanol de segunda geração já é produzido em escala comercial em diferentes regiões do mundo (Tabela I). No Brasil estão instaladas duas usinas em escala

comercial, a Raízen – unidade Costa Pinto em Piracicaba/SP e a GranBio em São Miguel dos Campos/AL. As duas usinas utilizam como matéria-prima resíduos (bagaço e palha) da principal matéria-prima para a produção de etanol 1G, a cana-de-açúcar. Na Itália, a Beta Renewables utiliza as biomassas de palha de trigo, palha de arroz e arundo. Nos Estados Unidos estão instaladas três usinas para a produção de etanol a partir da palha de milho, porém uma delas, a Abengoa, paralisou as operações no final de 2016.²³

Tabela I. Usinas de etanol de segunda geração com produção em escala comercial.^{21,23,}

24

Usina	Capacidade (Milhões L/ano)	Biomassa	Pré-tratamento
Raízen / Brasil	40,1	Bagaço cana-de-açúcar	Ácido diluído
GranBio / Brasil	83,2	Palha de cana-de-açúcar	Explosão a vapor
Poet-DSM / EUA	94,6	Palha de milho	Ácido diluído
Beta Renewables / Itália	75,7	Palha de trigo; Palha de arroz e arundo ²⁴	Explosão a vapor
DuPont / EUA	113,5	Palha de milho	Alcalino
Abengoa / EUA	94,6	Palha de milho	Ácido diluído

Além das usinas em escala comercial, diversas usinas em escala de demonstração (Tabela II) e piloto (Tabela III) utilizam biomassa lignocelulósica para a produção de etanol. No Brasil, o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) possui uma usina em escala de demonstração e a Petrobras uma usina em escala piloto.^{23,25}

Apesar de já ser produzido em diferentes países, o etanol 2G ainda enfrenta sérios desafios relativos ao processo de produção. Atualmente, as usinas estão operando abaixo da capacidade nominal e estima-se que o volume de etanol produzido por este processo será significativo em 2026.²⁶ A produção mundial de etanol de segunda geração em 2016 foi de aproximadamente 17,6 milhões de litros, sendo destes, 2 milhões de litros produzidos no Brasil. Estes números são pouco expressivos, já que a

produção total brasileira de etanol foi maior que 27 bilhões de litros e a norte americana maior que 58 bilhões de litros em 2016.

Tabela II. Usinas em escala de demonstração, biomassas utilizadas e capacidade (T ano⁻¹).²⁵

Nome e Local	Biomassas	Capacidade
Chempolis Ltd. /Oulu /Finlândia	Culturas energéticas	5.000
Clariant / Straubing / Alemanha	Palha de trigo	1.000
Centro de Tecnologia Canavieira – CTC / São Manoel / Brasil	Bagaço de cana-de-açúcar	3.000
COFCO Zhaodong Co / Zhaodong / China	Resíduos de milho	500
DuPont / Vonore / EUA	Resíduos agrícolas	750
Enerkem / Westbury / Canadá	Resíduos florestais e urbanos	4.000
Enerkem Alberta Biofuels LP / Edmonton / Canadá	Resíduos sólidos urbanos	30.000
Gevo / Luverne / EUA	Resíduos florestais	54.000
Iogen Corporation / Ottawa / Canadá	Bagaço de cana-de-açúcar, resíduo de milho e outros	1.600
Jilin Fuel Alcohol / Jilin / China	Palha	3.000
LanzaTech / Beijing / China	Resíduos	300
North European Oil Trade Ou / Gotemburgo / Suécia	Resíduos	4.000
Quad-County Corn Processors / Galva / EUA	Resíduo milho	6.000
Renmatix / Roma / EUA	Culturas energéticas	500
Shandong Zesheng Biotech Co. / Dongping / China	Palha	3.000
SP/EPAP / Ornskoldsvik / Suécia	Culturas energéticas	160
Tembec Chemical Group / Temiscaming / Canadá	Culturas energéticas	13.000
Woodland Biofuels / Sarnia / Canadá	Resíduos madeira	601
ZeaChem / Boardman / EUA	Culturas energéticas	750

Tabela III. Usinas em escala piloto, biomassas utilizadas e capacidade (T ano⁻¹).²⁵

Nome e Local	Biomassas	Capacidade
Aemetis / Montana / EUA	Culturas lignocelulósicas	500
American Process / Thomaston / EUA	Biomassa lignocelulósica	180
Anhui BBCCA Biochemical / Benghu / China	Culturas lignocelulósicas	5.000
Energy & Chemical Dep. East China University of Science and Technology / Shanghai / China	Culturas energéticas e resíduos florestais	600
Enerkem / Sherbrooke / Canadá	Resíduos florestais e urbanos	375
Greenfield Ethanol / Chatham / EUA	Culturas energéticas	30
Iowa State University / Boone / EUA	Culturas energéticas	200
Lignol / Vancouver / Canadá	Bagaço de cana-de-açúcar	30
Lignol / Grand Junction / EUA	Resíduos florestais	60
Lignol Innovations Ltd. / Burnaby / Canadá	Resíduos madeira	30
NREL / Golden / EUA	Culturas energéticas	100
Petrobras / Rio de Janeiro / Brasil	Bagaço de cana-de-açúcar	270
POET / Geórgia / EUA	Resíduos milho	60
Procethol 2G / Pomacle / França	Resíduos	2.700
Woodland Biofuels / Sarnia / Canadá	Resíduos	60

3.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Biomassas lignocelulósicas são as fontes de carbono mais abundantes da Terra. Resíduos agroindustriais, culturas energéticas, resíduos de celulose e biomassa lenhosa são alguns tipos de biomassas lignocelulósicas. A composição química destas biomassas, basicamente celulose, hemicelulose e lignina, possibilita seu uso como matéria prima para produção de energia e para a síntese de inúmeros compostos químicos.^{1,3,27, 28}

A proporção destes componentes é variável nas diferentes biomassas, sendo a composição média de 40-50% de celulose, 20-30% de hemicelulose e 10-25% de lignina.²⁷

O principal componente das biomassas lignocelulósicas, a celulose, é o polímero natural mais abundante da Terra. Este polímero é formado por moléculas de glicose unidas por ligações β -1,4 glicosídicas, sendo que a unidade repetitiva do polímero é a celobiose, formada por duas moléculas de glicose. Ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares formam microfibrilas que variam de 36 a 1200 cadeias de celulose com diâmetro de 5 a 15 μ m que tornam a celulose altamente insolúvel e resistente a maior parte dos solventes orgânicos.^{2,7,27,29,30} A Figura 1 apresenta a estrutura química de uma microfibrila de celulose.

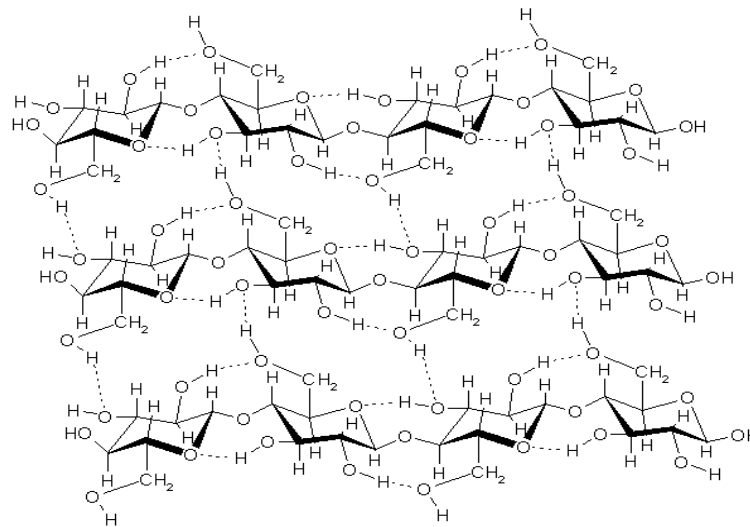


Figura 1. Estrutura química da celulose.⁷

A hemicelulose é o polímero ramificado formado por diferentes carboidratos, de cinco carbonos (xilose e arabinose), e seis carbonos (glicose, galactose e manose). Além dos carboidratos, a hemicelulose pode ser constituída por diferentes ácidos hexaurênicos (ácido glucurônico, 4-O-metil glucurônico e ácido galactourônico) e deoxiexoses (ramanose e fucose). A Figura 2 apresenta as moléculas que compõem as cadeias de hemicelulose e na Figura 3 está apresentada uma estrutura de hemicelulose formada por moléculas de xilose na cadeia principal.^{2,13,14,27}

A composição química da hemicelulose pode variar com a espécie vegetal e estágio de desenvolvimento da planta, sendo quatro os principais tipos de hemicelulose

(xilanas, xiloglicanas, glicanas e mananas) classificadas de acordo com o carboidrato majoritário. O tipo mais abundante de hemicelulose são as xilanas constituídas por D-xilose unidas por ligações β -1,4 glicosídicas na cadeia principal e resíduos de outros carboidratos nas ramificações laterais. As xiloglicanas são constituídas de cadeia principal formada por unidades de D-glicose unidas por ligações β -1,4 ou β -1,3 glicosídicas e ramificações laterais constituídas principalmente por xilose.^{13,14,31}

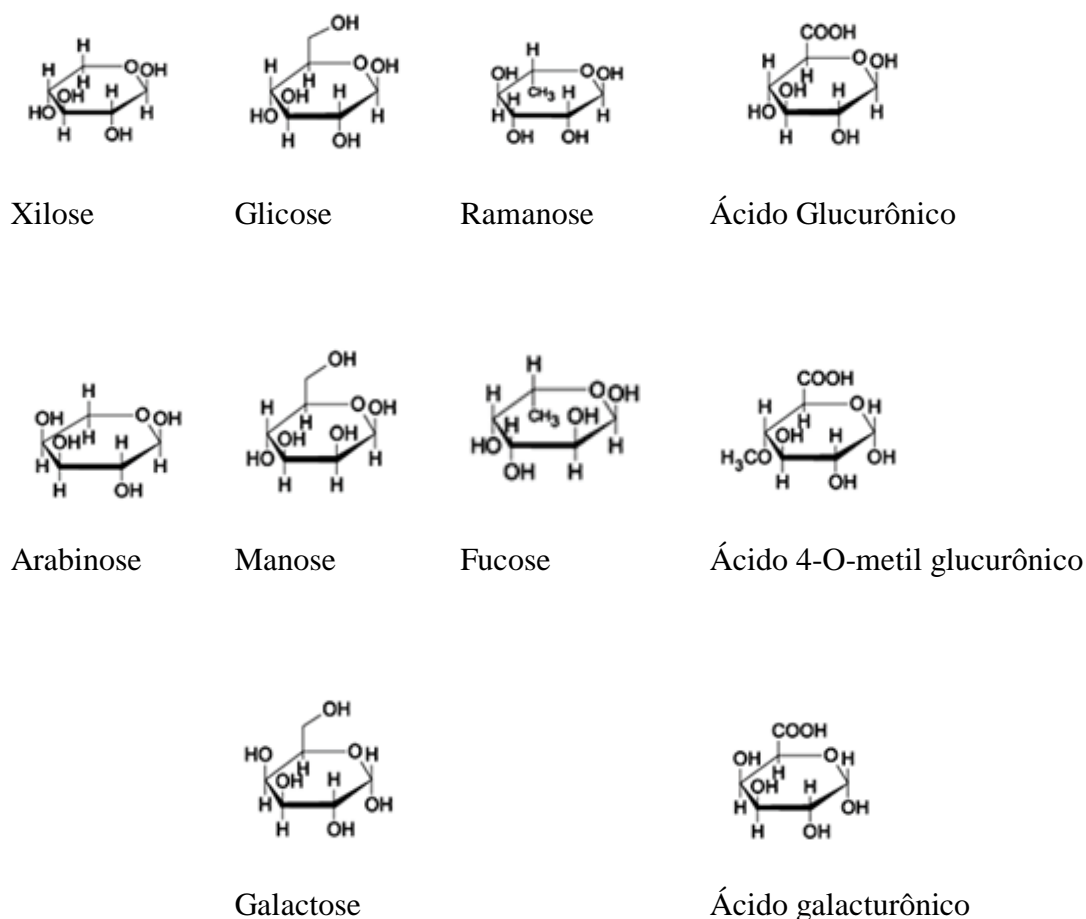


Figura 2. Moléculas de açúcares que podem ser encontradas nas cadeias de hemicelulose.³²

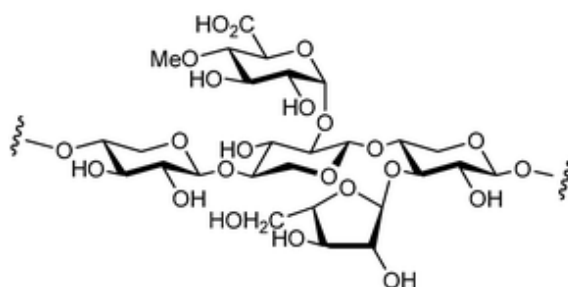


Figura 3. Estrutura de hemicelulose.³³

A lignina apresenta estrutura tridimensional complexa e altamente ramificada baseada em precursores monoméricos *p*-hidroxibenzil (H), guaiacila (G) e siringila (S) (Figura 4) derivados do álcool *p*-coumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 5), respectivamente. A estrutura polimérica das ligninas é dinâmica sendo variável em função do tipo de planta. Nas diferentes estruturas os precursores monoméricos estão ligados através de ligações carbono-carbono e carbono-oxigênio. A Figura 6 apresenta as principais ligações identificadas em ligninas de madeira mole. A razão entre as unidades precursoras, a proporção de cada ligação e a massa molecular variam de acordo com a espécie vegetal. Em madeiras moles são encontradas principalmente as unidades guaiacila (G), em madeiras duras as unidades guaiacila (G) e siringila (S) e em gramíneas as três unidades são encontradas. A Figura 7 apresenta a estrutura da lignina.^{2,13,14,34,35}

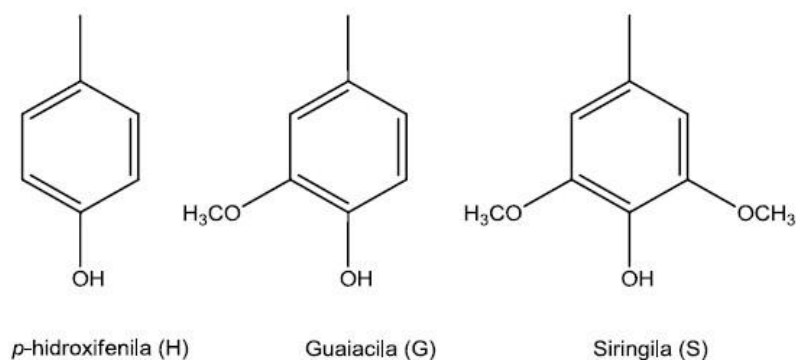


Figura 4. Núcleos fenólicos encontrados na lignina.⁷

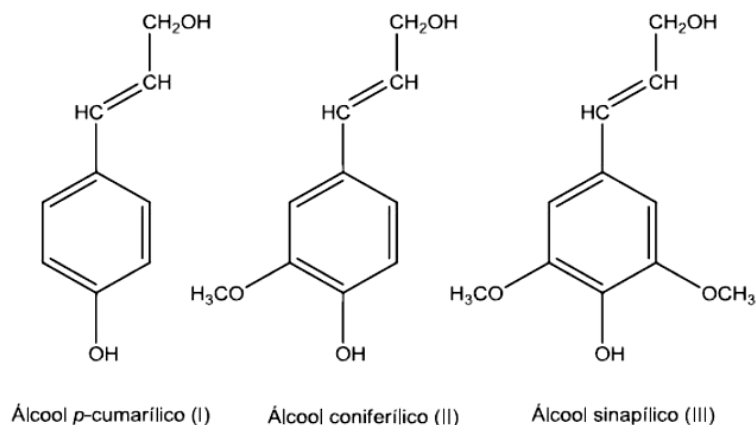


Figura 5. Unidades precursoras monoméricas da lignina.⁷

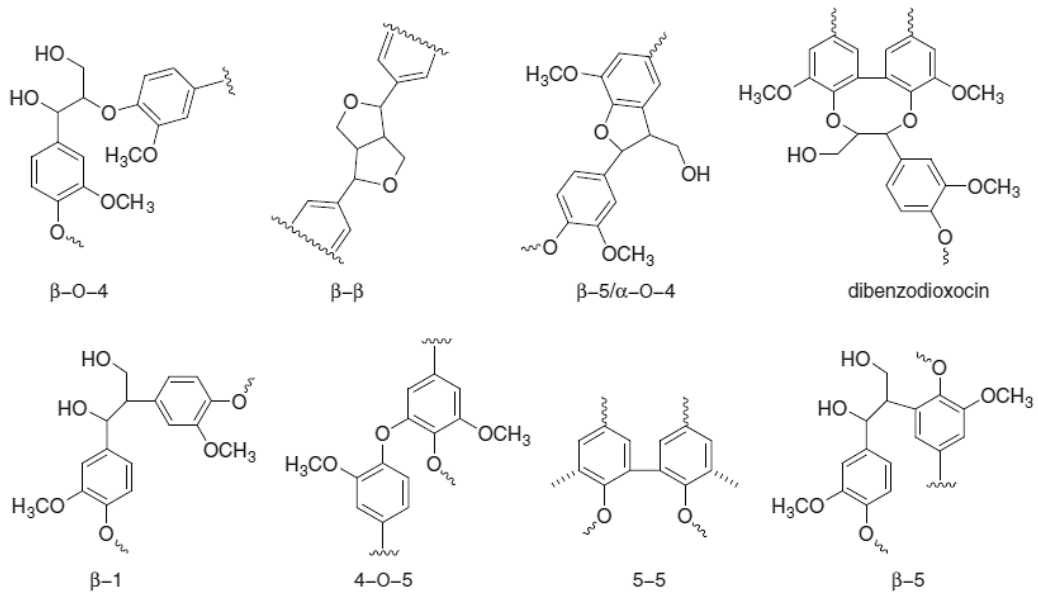


Figura 6. Principais ligações identificadas em ligninas.³⁵

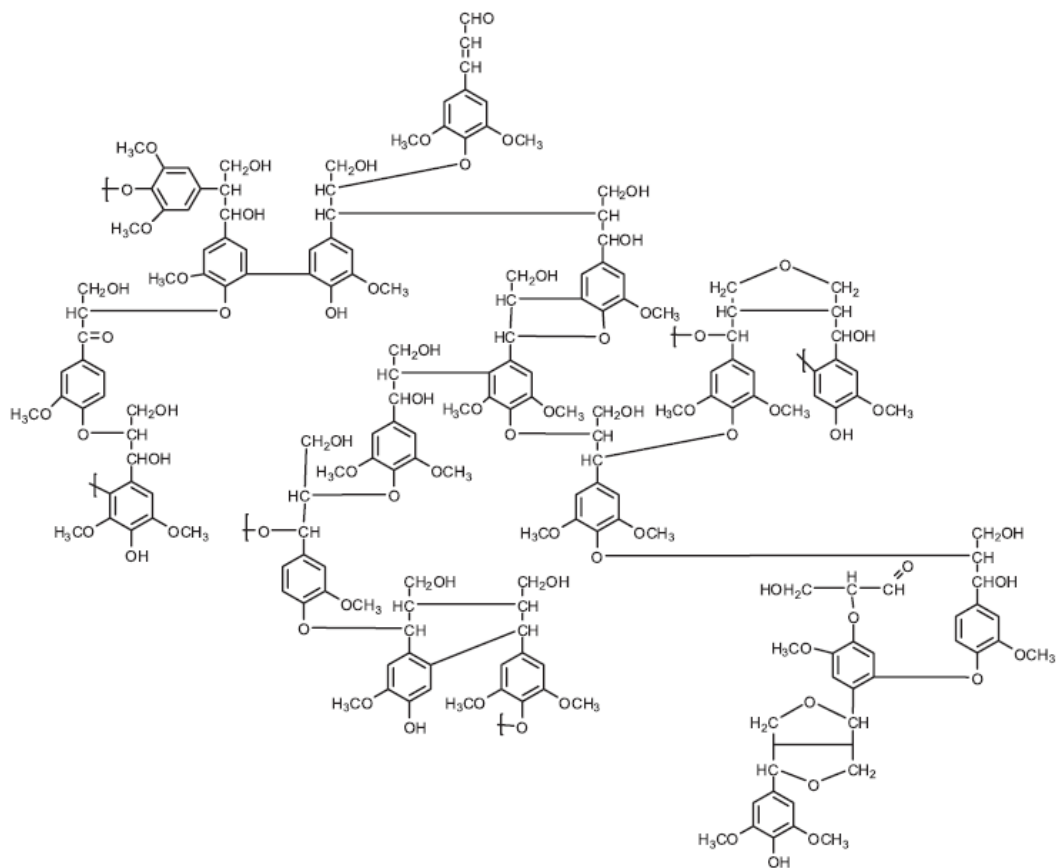


Figura 7. Estrutura química da lignina.⁷

A celulose, a hemicelulose e a lignina estão intimamente associadas na estrutura lignocelulósica que compõe a parede celular das plantas, atuando como barreira natural com a função de proteção à degradação microbiana e mecânica. Outros componentes como alcaloides, terpenos, pectinas, carboidratos, saponinas, polifenóis, gomas, resinas entre outros, são encontrados em menores proporções nas biomassas lignocelulósicas.^{13,27}

Em função da variabilidade na composição química e propriedades físico-químicas das diferentes biomassas lignocelulósicas, todas as etapas do processo de produção de etanol de segunda geração necessitam de otimização para a obtenção de maiores rendimentos e menor consumo de energia.³⁶

3.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

A produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas consiste, basicamente, nas etapas de pré-tratamento da biomassa, hidrólise ou sacarificação para a produção de açúcares fermentáveis e fermentação dos açúcares para produção de etanol seguida da destilação do etanol produzido (Figura 8).^{1,21,36,37,38}



Figura 8. Principais etapas do processo de produção de etanol de segunda geração.

3.3.1 Pré-tratamento

Para o aproveitamento da biomassa lignocelulósica é necessário o fracionamento dos componentes e desconstrução da estrutura complexa por métodos de pré-tratamento (Figura 9).^{2,27}

Os principais objetivos desta etapa são a quebra de ligações das moléculas que compõem a biomassa, redução da cristalinidade da celulose e adequação às condições de reação para transformação bioquímica.^{2,27,39,40,41}

Diferentes tipos de pré-tratamento podem ser utilizados para o preparo da biomassa, os quais podem ser classificados em físicos, químicos ou biológicos. A

escolha do processo de pré-tratamento deve ser realizada de acordo com a natureza da biomassa, de maneira que se obtenha maior rendimento de açúcares e menor concentração de produtos de degradação.^{2, 27,41,42, 43}

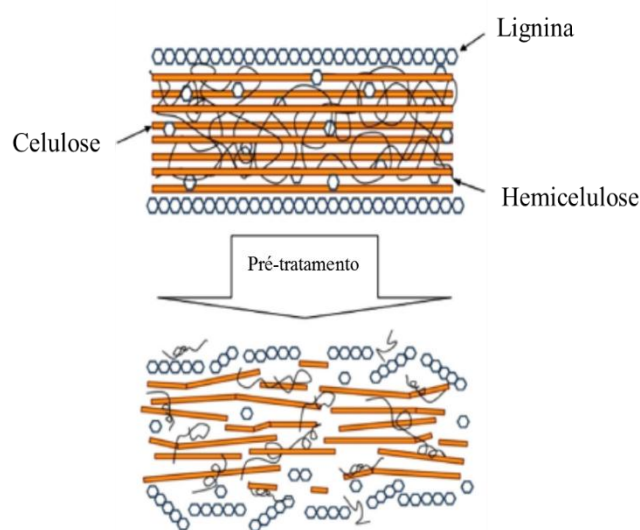


Figura 9. Representação da estrutura lignocelulósica da parede celular de plantas.¹

O uso de temperatura, pressão, radiação, congelamento e moagem da biomassa são classificados como métodos físicos de pré-tratamento, os quais têm o objetivo de aumentar a área superficial e reduzir o tamanho de partícula, e conseqüentemente diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da biomassa. Pré-tratamentos físicos para a redução do tamanho de partícula são conduzidos na primeira etapa de pré-tratamento e usualmente utilizados combinados com outros métodos.²

No pré-tratamento químico, ácidos, bases, solventes orgânicos e líquidos iônicos são utilizados com o objetivo de separar as frações da biomassa. O pré-tratamento químico mais utilizado consiste na adição de ácido à biomassa para a hidrólise dos polissacarídeos, atuando principalmente na solubilização da hemicelulose. Neste tipo de pré-tratamento, diferentes ácidos podem ser utilizados, tais como, o nítrico, fosfórico, clorídrico, sendo o ácido sulfúrico o mais utilizado. Além do tipo e da concentração do ácido, outros fatores como a temperatura e tempo têm influência nos rendimentos dos açúcares liberados.^{2,5, 27,20}

Odega e Petri (2010)⁴³ descrevem o mecanismo de hidrólise ácida da celulose (Figura 10), no qual o oxigênio glicosídico é protonado e a ligação C₁-O é quebrada gerando um carbocátion que é estabilizado pela deslocalização do par de elétrons do

oxigênio do anel glicosídico do carbono adjacente. A última etapa da despolimerização é o ataque nucleofílico da água ao C₁ e regeneração do ácido.

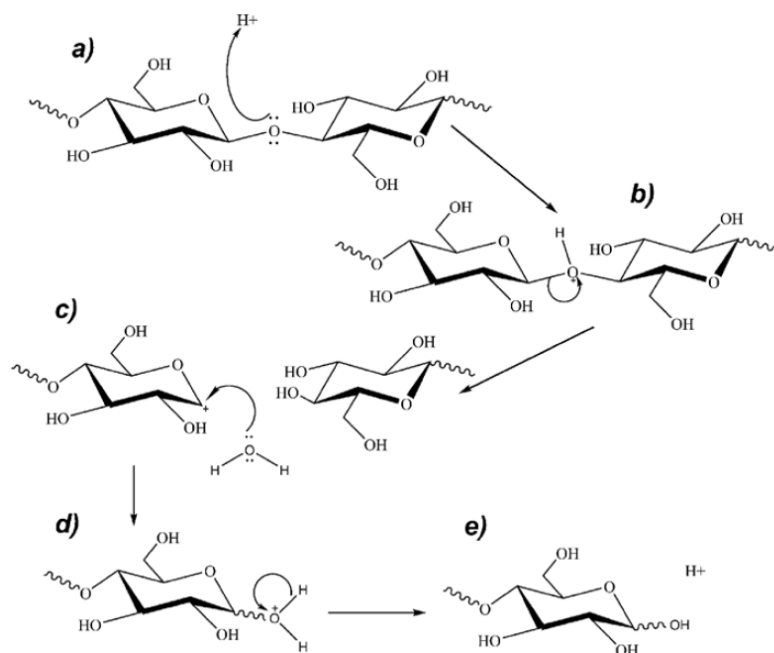


Figura 10. Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido.²⁰

A hidrólise ácida da hemicelulose segue mecanismo similar ao da celulose, sendo que a estrutura amorfa da hemicelulose não requer condições tão severas quanto as necessárias à hidrólise da celulose.⁴³ Em função desta característica, o pré-tratamento ácido é bastante utilizado para a recuperação de açúcares da hemicelulose os quais têm aplicações tanto na produção de etanol pela fermentação de pentoses como na síntese de moléculas para os mais diversos usos.^{13,44,45}

Apesar de possibilitar alto rendimento de açúcares, a utilização de ácidos pode comprometer o rendimento da fermentação pela formação de 5-hidroximetilfurfural, furfural e outros produtos de degradação que são prejudiciais à ação de microrganismos utilizados no processo fermentativo.^{39, 43}

O pré-tratamento alcalino pode ser realizado utilizando hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, amônia entre outros, sendo um método efetivo para a remoção de lignina. Durante o pré-tratamento alcalino ocorre dissolução da lignina e quebra das ligações éster intermoleculares alterando o grau de polimerização e as propriedades físicas da biomassa. Particularmente, o hidróxido de sódio ataca a ligação entre lignina e hemicelulose na estrutura do complexo lignina-carboidrato quebrando ligações éter e

éster, além de atuar na quebra de ligações éster e carbono-carbono na molécula da lignina.^{2,27,46, 47}

Pré-tratamentos alcalinos podem ser conduzidos em condições brandas de temperatura e pressão reduzindo a degradação de açúcares, porém outros produtos da despolimerização da lignina e os sais gerados durante o processo devem ser removidos antes da etapa de hidrólise enzimática.^{41, 48} Para a remoção destes compostos, a lavagem da biomassa é usualmente utilizada, o que pode ser considerado uma desvantagem deste processo em função do volume de água gasto.⁴¹

A remoção de lignina no pré-tratamento é uma importante etapa para o aumento da eficiência da hidrólise enzimática dos carboidratos presentes na biomassa.^{2,27,41,49}

Em função das características dos pré-tratamentos destacados acima, o uso de pré-tratamentos ácido e alcalino combinados pode aumentar o rendimento de hidrólise comparado a pré-tratamentos ácido ou alcalino separados, pela remoção de hemicelulose e lignina, tornando a biomassa com alto teor de celulose.⁵⁰ Guo et al. (2013)⁵¹ avaliaram as condições de pré-tratamento hidrotérmico ácido e alcalino em duas etapas da biomassa de *Miscanthus* e compararam com pré-tratamento ácido e alcalino em etapa única separada, os resultados mostraram maior concentrações de glicose e xilose obtidas a partir da biomassa pré-tratada em duas etapas do que em etapa única separada. Similarmente, Wang et al.(2013)⁵² obtiveram maiores rendimentos de glicose a partir de biomassa residual de milho submetida ao pré-tratamento ácido e alcalino em duas etapas do que a partir do pré-tratamento ácido ou alcalino. Em contraste, Guilherme et al. (2015)⁵³ aplicando diferentes pré-tratamentos em bagaço de cana-de-açúcar obtiveram maiores concentrações de glicose e xilose somente com pré-tratamento alcalino do que quando aplicado o pré-tratamento ácido e alcalino combinados.

Ainda classificado com pré-tratamento químico, o processo organosolv utiliza solventes orgânicos como etanol, acetona, metanol, etilenoglicol, glicerol e água na presença ou ausência de catalisadores orgânicos ou inorgânicos para hidrolisar ligações entre a lignina e a hemicelulose, ligações internas da lignina e ligações glicosídicas na celulose e principalmente, na hemicelulose. Processos organosolv são utilizados para a extração de lignina de alta qualidade, porém para a produção de etanol estes processos são caros em função dos custos dos solventes e catalisadores, da necessidade de recuperação dos solventes, além de medidas adicionais de segurança que devem ser adotadas em relação à inflamabilidade dos solventes.^{41,47} O uso de líquidos iônicos é

outra alternativa no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, que possibilita a dissolução da celulose pela quebra de ligações de hidrogênio entre as cadeias, porém o custo e a viscosidade do meio durante o processo são fator limitantes para a aplicação em maiores escalas.²

Pré-tratamentos físicos-químicos também são empregados para a desconstrução da biomassa lignocelulósica, sendo os principais métodos a explosão a vapor, a explosão com dióxido de carbono e a explosão da fibra com amônia (AFEX - *Ammonia fiber explosion*).^{2,54,47}

Outros métodos de pré-tratamento também podem ser utilizados na desconstrução da biomassa, como a utilização de microrganismos (fungos e bactérias) que resulta na degradação da lignina, e são descritos como pré-tratamento biológicos.⁴⁰ Pré-tratamentos biológicos são eficientes e ecologicamente corretos, porém apresentam a desvantagem de consumo de carboidratos pelos microrganismos e longos tempos de processo. Além disso, a viabilidade destes processos em maior escala é comprometida pela necessidade de condições estéreis.^{41,55,56}

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é fundamental para a viabilidade técnica e econômica do processo de produção de etanol 2G. Dependendo da escolha dos métodos de pré-tratamento, a transformação da biomassa para as etapas subsequentes do processo pode aumentar o consumo de água e ainda requerer equipamentos especiais, elevando os custos de produção, o que torna essencial o planejamento e otimização do pré-tratamento em função das características da biomassa que será utilizada no processo.⁵⁵

3.3.2 Hidrólise Enzimática

Após a adequação da biomassa no processo de pré-tratamento, as etapas de hidrólise e fermentação podem ser realizadas de forma sequencial ou simultânea. A digestão da biomassa na etapa de hidrólise pode ser catalisada por ácidos ou enzimas (celulases). A hidrólise enzimática apresenta vantagens em relação à hidrólise ácida, como condições de reação mais brandas de pH, temperatura e pressão. Além disso, a formação de produtos tóxicos ao processo fermentativo é limitada pela especificidade dos sistemas enzimáticos. A desvantagem da hidrólise enzimática é o alto custo das enzimas que pode inviabilizar economicamente o processo de produção de etanol.^{39,57}

A celulose é o principal polímero da biomassa lignocelulósica de interesse para a produção de etanol de segunda geração, portanto o uso de classe de enzimas

denominadas celulasas é fundamental para a quebra de ligações glicosídicas e liberação de moléculas de glicose. Celulasas são compostas de diferentes enzimas as quais são divididas nas seguintes classes: Endoglucanases (EG, endo-1,4-β-D-glucanases, EC 3.2.1.4) - atacam regiões amorfas da cadeia polimérica gerando novos terminais facilitando a desconstrução da biomassa pela diminuição do grau de polimerização; Exoglucanases (CBH, celobiohidralase, 1,4-β-D-glucan, EC 3.2.1.91) - atuam nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose liberando celobiose e as β-glucosidases (EC 3.2.1.21) que catalisam a hidrólise de celobiose produzindo glicose.^{30,42, 43,58}

O mecanismo de quebra de ligações glicosídicas da celulose catalisada por celulasas pode ocorrer com retenção ou inversão do carbono anomérico dependendo da enzima utilizada.³⁰

A hidrólise enzimática da celulose tem início com a ação das endoglucanases que atacam regiões amorfas da cadeia polimérica liberando oligossacarídeos, reduzindo o grau de polimerização e gerando novas extremidades redutoras e não redutoras. Em sequência, a hidrólise da celulose tem continuidade pela ação das exoglucanases que atacam as extremidades redutoras e não redutoras removendo camadas da estrutura celulósica e disponibilizando pontos internos para a ação das endoglucanases. Este sinergismo entre as celulasas aumenta a eficiência do processo de desconstrução da biomassa (Figura 11).^{30, 43}

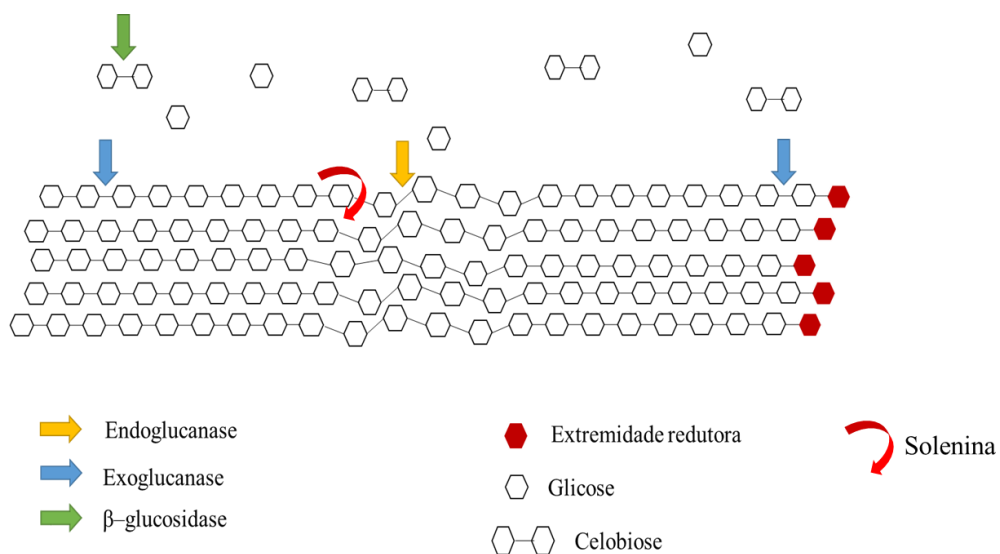
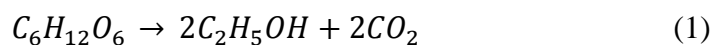


Figura 11. Representação esquemática da desconstrução enzimática de celulose.³⁰

Além das celulases, outra classe de proteínas encontradas na parede celular das plantas, as expansinas, atuam no rompimento das ligações de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose e ligações entre a celulose e outros polissacarídeos, participando da degradação da celulose. As soleninas, proteínas com atividade similar as expansinas, também atuam na degradação da celulose pelo afrouxamento da estrutura da parede celular sem causar a hidrólise dos polissacarídeos.^{59,60, 61}

3.3.3 Fermentação

A fermentação é a etapa na qual açúcares solúveis são convertidos a etanol pela ação de microrganismos. Na ausência de oxigênio uma molécula de glicose é transformada em etanol e dióxido de carbono (equação 1), com rendimento estequiométrico de 0,511 g de etanol por grama de glicose.^{36,50}



Nos processos de produção de etanol de primeira geração, a partir de biomassas sacarídeas e amiláceas, o principal açúcar disponível para fermentação é a glicose. Já nos processos de segunda geração, a partir da biomassa lignocelulósica, além da glicose, outros açúcares estão disponíveis para a fermentação. O principal açúcar obtido da fração hemicelulósica é a xilose.^{36,50}

Diferentes estratégias de fermentação podem ser adotadas para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica tais como: hidrólise separada da fermentação (SHF), a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), a sacarificação e co-fermentação simultânea (SSCF) e o bioprocesso consolidado (CBP).^{21, 39, 62,63}

Em processos nos quais as etapas de hidrólise e fermentação são realizadas separadamente (SHF), primeiramente é realizada a hidrólise da biomassa pré-tratada e os açúcares liberados da biomassa são fermentados, posteriormente, em outra etapa do processo. Neste processo é possível que as condições ótimas de cada etapa sejam mantidas, visto que, geralmente, a melhor atividade catalítica das celulases ocorre em temperaturas acima da ideal para a fermentação.^{21,39,42} A maioria das enzimas celulolíticas apresentam atividade máxima em temperatura de 50°C, enquanto que a faixa de temperatura ideal para fermentação com microrganismos, usualmente utilizados industrialmente (*Saccharomyces cerevesiae*), é de 28-37°C. A principal desvantagem desta estratégia de fermentação é a inibição das celulases pelas altas concentrações de

substratos (glicose e celobiose) liberadas no meio durante a etapa de hidrólise enzimática.^{21,28}

Já o processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) possibilita que, em um mesmo sistema reacional, a glicose liberada seja fermentada por microrganismos, diminuindo assim a inibição das celulasas pelo acúmulo de glicose e celobiose.^{39,42} A diminuição do número de reatores, a menor quantidade de enzima necessária para hidrólise e a diminuição do risco de contaminação do meio pela presença de etanol são vantagens deste tipo de processo. A principal desvantagem deste processo está na adequação das condições operacionais, como a temperatura que difere para a atividade ótima das celulasas e para a fermentação por leveduras. Geralmente processos SSF são conduzidos em temperatura em torno de 37°C, porém esta temperatura pode reduzir significativamente a taxa de conversão de celulose em glicose.^{21, 28}

Esta limitação do processo é objetivo de pesquisas que vêm sendo desenvolvidas com foco em enzimas com maiores atividades em menores temperaturas e na seleção de leveduras termotolerantes.⁵⁰

Outro fator importante que deve ser considerado no processo SSF é a carga de sólidos, ou carga de substrato. Para que o processo de produção alcance altos rendimentos de etanol é necessário o uso de alta carga de sólidos para a obtenção de rendimentos de açúcares próximos aos obtidos em processos 1G (matérias primas sacarídeas e amiláceas). Porém, o aumento da carga de sólidos traz limitações ao processo como transferência de massa dificultada pela alta viscosidade do meio e o aumento da concentração de inibidores no meio reacional. Cargas de sólidos em torno de 7 a 10% podem reduzir as taxas de fermentação.²¹

A condução do processo SSF em batelada alimentada permite que a viscosidade do meio reacional seja mantida baixa pela adição parcial de biomassa pré-tratada. O processo é iniciado com menor concentração de sólidos e após a liquefação do meio pela ação das enzimas celulolíticas, são realizadas alimentações do meio com a biomassa pré-tratada.^{5,21}

Outra configuração possível na produção de etanol 2G em processos SSF é a condução da etapa de pré-hidrólise antes da inoculação do microrganismo para a fermentação. Processos realizados com pré-hidrólise podem ser denominados sacarificação e fermentação semi-simultâneas (SSSF), pré-hidrólise e sacarificação e fermentação simultâneas (PSSF), sacarificação e fermentação simultâneas com

inoculação tardia e sacarificação e fermentação simultâneas não isotérmica (NSSF), os quais consistem na realização da pré-hidrólise em primeira etapa a temperatura de 50°C, ótima para as celulases, seguida de redução da temperatura e adição do microrganismo para a fermentação. As principais vantagens desta estratégia são altas taxas de hidrólise na primeira etapa do processo pela adequada temperatura, altas concentrações de glicose disponíveis e viscosidade do meio reduzida no momento da inoculação do microrganismo.²¹

Diferente das biomassas utilizadas em processos fermentativos de primeira geração, a partir de biomassas lignocelulósicas são obtidos diferentes açúcares de 5 e 6 carbonos oriundos das frações celulósicas e hemicelulósicas. Neste contexto, estratégias de fermentação devem ser empregadas para o melhor aproveitamento destes açúcares. Duas estratégias diferentes podem ser conduzidas com o objetivo de fermentação de pentoses e hexoses, a sacarificação e co-fermentação simultânea (SSCF) e o bioprocessos consolidado (CBP), descritos a seguir.

A sacarificação e co-fermentação simultânea (SSCF) é o processo em que a hidrólise enzimática e a fermentação são conduzidas em um mesmo reator pela adição de enzimas e microrganismos capazes de fermentar pentoses e hexoses. *Saccharomyces cerevisiae* pode ser modificada geneticamente para fermentação de xilose.²⁸

O bioprocessos consolidado é conduzido com microrganismo capaz de produzir enzimas para a degradação de biomassa lignocelulósica e fermentar os açúcares para a produção de etanol. A Figura 12 apresenta uma representação das estratégias descritas para produção de etanol de segunda geração.

Características desejáveis de microrganismos para fermentação de açúcares são, alto rendimento de etanol, alta produtividade e tolerância a altas concentrações de etanol. Diferentes microrganismos podem ser empregados na fermentação de açúcares, sendo as leveduras as mais utilizadas.

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são utilizadas industrialmente para a produção de etanol de primeira geração, pois apresentam alta produtividade e tolerância ao etanol e a compostos inibidores. Essas leveduras são capazes de crescer em pH relativamente baixo evitando contaminação por outras bactérias e são eficientes na fermentação de hexoses (glicose, manose e galactose), porém quando biomassas lignocelulósicas são utilizadas como matéria-prima, a fração de açúcares obtidos da hemicelulose, principalmente composta por xilose, não pode ser fermentada por cepas

nativas de *S. cerevisiae*. A engenharia metabólica tem sido utilizada para modificar *S. cerevisiae* para a produção de etanol a partir de xilose.^{30,64}

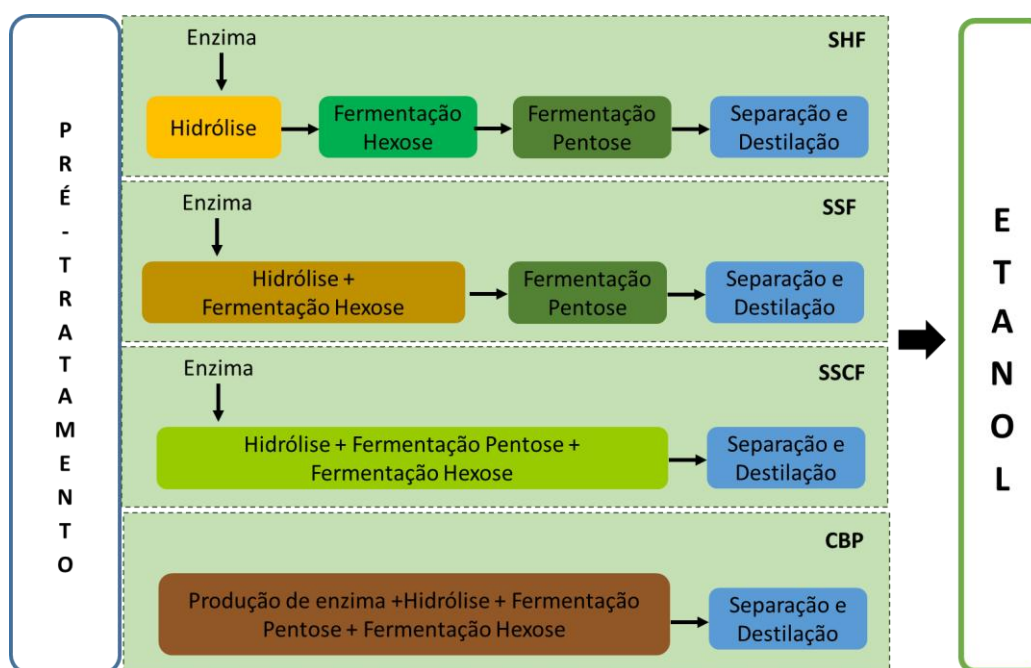


Figura 12. Estratégias de fermentação para produção de etanol de segunda geração.⁵

Na produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, além da fermentação da glicose, é extremamente importante a fermentação de pentoses para obtenção de maiores rendimentos de etanol. O uso de outros microrganismos capazes de fermentar pentoses e que apresentam os requisitos desejáveis para o emprego em fermentações industriais ainda é um desafio. Cepas da bactéria *Escherichia coli* obtidas através de engenharia genética são capazes de utilizar hexoses e pentoses e apresentam taxas de crescimento rápido, porém o uso em escala industrial ainda é limitado em função do baixo desempenho em meios ausentes de antibióticos.^{65,66}

A levedura *Scheffersomyces stipitis* (também conhecida como *Pichia stipitis*) é naturalmente capaz de fermentar xilose e amplamente estudada para utilização em processos de produção de etanol de segunda geração. O isolamento e modificação genética de novas linhagens vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de tornar viável seu uso em escala industrial, visto que para o alcance de máxima produção de etanol condições micro-aeróbicas são requeridas.⁶⁵

Utilizada em escala industrial, a bactéria *Zymomonas mobilis* apresenta tolerância a altas concentrações de açúcar, alto rendimento de etanol com produtividade

próxima às obtidas com *S. cerevisiae*, sendo capaz de utilizar como substrato glicose, frutose e sacarose, porém não é capaz de metabolizar xilose e arabinose. Diferentes modificações já foram realizadas visando o consumo de xilose e arabinose por cepas deste microrganismo, mas a baixa tolerância a inibidores como ácido acético, acetato de sódio, vanilina, siringaldeído, HMF e furfural e a baixa tolerância a pH baixo ainda limitam seu uso em escala industrial para a produção de etanol de segunda geração.⁶⁵

A capacidade do microrganismo de fermentar os diferentes açúcares obtidos da biomassa lignocelulósica, com alto rendimento, produtividade e concentração final de etanol, somada à tolerância a altas concentrações de etanol e açúcares, são características desejáveis de microrganismos utilizados para a produção de etanol de segunda geração. Além dessas variáveis, a tolerância a variações de pH e da temperatura, bem como a presença de inibidores como HMF, furfural e ácido acético também são extremamente almejadas. Os microrganismos descritos acima não possuem todas estas características, apresentando, cada um deles, vantagens e desvantagens para aplicações em fermentações industriais. Neste sentido, a seleção e melhoramento de microrganismos é tema de diversas linhas de pesquisa que visam à adequação às condições do processo de etanol de segunda geração em escala industrial.⁶⁵

Diversos fatores afetam a conversão de biomassa em etanol, como o tipo de substrato, de enzimas, de microrganismos, além dos parâmetros das etapas do processo como pH, temperatura, tempo de incubação, carga de sólidos, carga de microrganismos e presença de produtos secundários no meio de fermentação.^{2, 36}

A temperatura pode ter influência no crescimento de microrganismos no meio, afetando o rendimento de fermentação. A faixa ideal de temperatura é de 20°C a 35°C sendo que o aumento da temperatura acima de 40°C diminui significativamente o rendimento de etanol como resultado de estresse osmótico sofrido pelas células. Temperaturas abaixo da faixa ideal diminuem a taxa de crescimento das células e a tolerância a etanol.^{2, 36}

O pH do meio tem influência nos rendimentos de fermentação pois a quantidade de prótons (H^+) pode mudar a carga da membrana plasmática afetando a permeabilidade de nutrientes nas células. A faixa de pH ideal varia de acordo com o microrganismo, para *S. cerevisiae* é de 4-5 e para *Z. mobilis* de 5-6.^{2, 36}

A eficiência de conversão de açúcares em etanol e o crescimento das leveduras também são afetados pelo tempo. Curtos períodos de tempo podem acarretar em fermentação insuficiente e longos períodos de fermentação podem causar efeitos tóxicos

ao crescimento de microrganismos pela alta concentração de etanol e pela formação de produtos secundários. Na literatura é reportado período ideal para fermentação alcoólica de 48-72 h, porém em diferentes trabalhos são relatados tempos de até 96 h.³⁶

O aumento da concentração inicial de substrato aumenta o rendimento de fermentação até certo nível, porém, concentrações muito altas de açúcar podem exceder a capacidade de absorção da célula sendo necessário a otimização deste parâmetro na fermentação para viabilidade do processo.

Apesar de apresentar grandes vantagens do ponto de vista ambiental como a utilização de matéria-prima renovável, a diminuição de gases de efeito estufa, a diminuição da dependência de derivados de petróleo e o uso de biomassas que podem ser consideradas resíduos, a produção de etanol de segunda geração ainda apresenta alguns gargalos no que se refere ao elevado custo de enzimas para a hidrólise de polissacarídeos e a pouca eficiência na fermentação de pentoses.^{30, 39, 43}

Estudos nas diferentes etapas do processo de produção de etanol de segunda geração estão sendo realizados em diversos países para o desenvolvimento do processo, tais como o desenvolvimento de genótipos de plantas com maiores teores de fibras, a otimização das etapas de pré-tratamento, o melhoramento de microrganismos para a produção de enzimas e para a fermentação de hexoses e pentoses simultaneamente.

A escolha da matéria-prima lignocelulósica deve considerar as características físico-químicas da biomassa, disponibilidade, rendimentos e volume de produção de modo que o processo produtivo seja favorecido.⁵⁰

3.4 ARUNDO DONAX L.

O arundo (*Arundo donax* L.), também denominado cana-do-reino, cana gigante ou cana selvagem (Figura 13) pode ser encontrado em diversas regiões do mundo, como na Ásia, Europa, África, América do Sul, América do Norte e Austrália.^{11-13,67} Esta planta já foi utilizada como matéria-prima para a produção de papel e celulose e atualmente está novamente sendo proposta como matéria-prima alternativa à madeira.⁶⁸ Outras aplicações das fibras de arundo são para confecção de instrumentos musicais de sopro como clarinetes, saxofones e recentemente tem sido proposto como reforço em compósitos poliméricos e como matéria-prima para produção de bioenergia.^{12,69}

Planta de crescimento rápido e grande capacidade vegetativa, o arundo é uma gramínea pertencente à família *Poaceae* que apresenta elevada produtividade de biomassa e boa adaptabilidade a diferentes condições de cultivo, como crescimento em solo com alto teor de água próximo a cursos d'água. A planta também é robusta em relação às condições climáticas apresentando limitações apenas ao frio.^{11-13, 70, 71}

Estudos comprovam alta produtividade de biomassa em condições de baixo fornecimento de fertilizantes e ausência de pesticidas, além de condições de cultivo inapropriadas para a maioria das culturas agrícolas, como solos salinizados, uso de água de baixa qualidade e efluentes.⁷² Outra vantagem no cultivo de arundo é a resistência da planta a pragas e doenças, além do baixo investimento após o estabelecimento, por ser uma cultura perene anual.⁷³



Figura 13. Plantas de *Arundo donax* L. cultivadas na Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS.

A planta pode ser utilizada na fitorremediação de solos contaminados com diferentes metais como Hg, Cd, Cr, As, Pb, Ni, Mn, Zn e Fe, além de ser utilizada no tratamento de efluentes urbanos e industriais.¹¹

O rendimento de biomassa de arundo pode variar de acordo com o local e condições de cultivo, com a época de colheita e com o ciclo da planta. Angelini et al.

(2009)⁸ obtiveram rendimentos de até 51 T ha⁻¹ano⁻¹ na Itália, segundo Seca et al. (2000)⁷⁴ o rendimento de arundo em países do Mediterrâneo atinge 25 T ha⁻¹ano⁻¹. Corno et al. (2014)¹² apresenta dados de produtividade obtidos por diferentes autores maiores que 150 T ha⁻¹, porém o autor ressalta que estas produtividades foram obtidas com cultivos em condições de clima temperado e mediterrâneo. Em função das características de crescimento e propagação vegetativa, é considerada planta invasiva em alguns locais como na Califórnia e no sul da Itália.¹²

Além de alta produtividade de biomassa, arundo apresenta maior retorno de energia sobre a energia investida (EROEI - *energy returned on energy invested*) do que espécies como *Sinensis* e *Panicum*.^{10,67} Em função destas características esta cultura apresenta potencial como matéria-prima para biocombustíveis em processos de combustão direta, gaseificação, pirólise e etanol de segunda geração.^{11-13,75}

Jeon et al. (2010)⁷⁶ avaliaram oito diferentes biomassas lignocelulósicas, entre elas o arundo, na produção de etanol de segunda geração. As biomassas foram submetidas à pré-tratamento ácido (H₂SO₄ 2%) e fermentação com *Z. mobilis* ZM4 (pZB5) e obtiveram concentração de etanol de 12,3 g L⁻¹ e rendimento teórico de 72%. Em comparação às outras biomassas avaliadas, os maiores rendimentos de etanol foram alcançados com bagaço de cana-de-açúcar e palha de trigo, porém os rendimentos obtidos com arundo foram superiores aos obtidos com biomassas de madeira.

Scordia et al. (2011)¹³ investigaram o efeito da temperatura, concentração de ácido oxálico e tempo de pré-tratamento de arundo. A biomassa pré-tratada foi submetida ao processo de sacarificação e fermentação simultâneos (SSF) utilizando enzima comercial e duas diferentes leveduras, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS 6054 para fermentação de xilose e celobiose e *Saccharomyces carlsbergensis* FPL-450 para a produção de etanol. A concentração máxima de etanol obtida foi de 18 g L⁻¹ e o rendimento teórico de etanol de 57%.

Bura et al. (2012)⁷³ avaliaram o uso de arundo como biomassa para a produção de etanol em processo composto por pré-tratamento por explosão a vapor com SO₂, hidrólise e fermentação e compararam os rendimentos obtidos de açúcares e etanol com a biomassa de *hybrid poplar* (biomassa energética na América do Norte). Os autores obtiveram rendimento máximo teórico de etanol de 79% que corresponde a 180 L T⁻¹ com a biomassa de arundo.

Pesquisas com a produção de etanol a partir de biomassa de arundo também estão sendo realizados na América do Sul. Loaces, et al. (2017)⁷⁷ investigaram a

produção de etanol a partir de biomassa de arundo coletada no Uruguai e submetida aos pré-tratamentos com ácido sulfúrico diluído e água quente, separadamente. A produção de etanol foi conduzida por processos SHF e SSF na presença de *Escherichia coli*, onde a concentração máxima de etanol obtida foi de 25 g L⁻¹.

No Brasil poucos trabalhos relatam estudos com a cultura do arundo. Vasconcelos et al. (2007)⁷⁸ avaliaram a produtividade de biomassa de arundo cultivados em Pelotas/RS em diferentes métodos de propagação utilizando três diferentes adubações orgânicas durante três anos. O rendimento de biomassa seca obtido no terceiro ano foi de 11,6 T ha⁻¹, considerado baixo, porém os autores ressaltam que os rendimentos de biomassa tendem a continuar aumentando até o sexto ano de cultivo.

O mapeamento, avaliação da taxa de crescimento e análise da variabilidade genética de populações de arundo no Distrito Federal foram realizados por Simões et al. (2013) com o objetivo de controle da espécie considerada invasora.⁷⁹

Lemons e Silva et al. (2015)¹¹ avaliaram o uso de biomassa de arundo coletada no município de Pelotas/RS para a produção de etanol, após o pré-tratamento químico em duas etapas (pré-tratamento com H₂SO₄ 1,1% v v⁻¹, 1:2,8 g mL⁻¹, 121°C por 30 minutos e pré-tratamento alcalino com NaOH 0,5M, 1:20 g mL⁻¹, 121°C por 30 minutos). A estratégia de fermentação utilizada foi SSF em batelada alimentada com carga de sólidos de 250 g L⁻¹ utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e o rendimento de etanol obtido foi de 75 L T⁻¹ de biomassa seca.

A produção de etanol de segunda geração ainda é um desafio, pois a eficiência e viabilidade do processo são influenciadas por muitos fatores. O tipo de matéria-prima, a escolha adequada dos métodos de pré-tratamento de modo a obter maiores concentrações de açúcares e menores concentrações de inibidores, a dosagem correta de enzimas, a obtenção de enzimas de menor custo, a escolha do microrganismo para a fermentação, as condições de cultivo para microrganismos, tipos de reatores e a escolha mais adequada da estratégia de fermentação são alguns dos fatores que contribuem para a eficiência e custos do processo. Neste sentido, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com foco na otimização de processos e o uso de ferramentas como a metodologia de superfície de resposta (MSR) para alcançar maiores concentrações de etanol e maior aproveitamento da matéria-prima.²¹

4. PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 COLETA, SECAGEM E PREPARO DA BIOMASSA

Plantas de arundo foram coletadas no município de Pelotas/RS, nos meses de maio de 2013 e junho de 2015. Após a coleta, as plantas foram trituradas em triturador de resíduos orgânicos a fim de reduzir o tamanho de partícula. A biomassa triturada foi mantida em estufa agrícola a 30°C para redução da umidade e então moída em moinho de facas. A biomassa foi mantida em estufa a 65°C *overnight* antes da realização dos pré-tratamentos para que não houvesse influência da umidade da biomassa.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

Após coleta, secagem e preparo, realizou-se a análise granulométrica da biomassa de arundo. Para as demais caracterizações, após trituração e secagem, a biomassa foi novamente moída em moinho de laboratório e peneirada em peneira de 0,5 mm visando a uniformização da mesma.

4.2.1 Análise Granulométrica

Para determinação da distribuição do tamanho de partículas da biomassa foram utilizadas peneiras com diâmetros de abertura de 1,00 mm, 0,5 mm, 0,25 mm, 0,105 mm e 0,053 mm. Após a agitação do conjunto de peneiras contendo a biomassa, a massa retida em cada peneira foi determinada.

4.2.2 Determinação da Umidade

Para determinação da umidade pesou-se 2,0000 g ± 0,0002 g de biomassa, em cadinho previamente seco e pesado, sendo a mesma mantida em estufa a 105°C até massa constante, de acordo com metodologia do NREL (*National Renewable Energy Laboratory*).⁸⁰ O teor de umidade na amostra foi calculado pela equação 2 e expresso pela média de triplicatas.

$$Umidade (\% m/m) = \left(\frac{Massa\ final\ cadinho - Massa\ inicial\ cadinho}{Massa\ amostra} \right) \times 100 \quad (2)$$

4.2.3 Determinação de Extrativos

A determinação de extrativos na biomassa foi realizada pelo método de Soxhlet de acordo com metodologia do NREL (*National Renewable Energy Laboratory*).⁸¹ Em cartuchos de celulose foram adicionadas 4,0000 ±0,002 g de biomassa seca, sendo a extração realizada primeiramente com 200 mL de água purificada por osmose reversa, adicionada a balão de 250 mL e os refluxos realizados até que não houvesse mais coloração no solvente no extrator de Soxhlet. Após remoção do excesso de água do sistema de extração uma segunda extração foi realizada com 200 mL de álcool etílico 95,0% p.a. O procedimento de extração foi realizado até que não houvesse mais coloração no solvente no extrator de Soxhlet. Ao final do processo de extração, o cartucho contendo a amostra livre de extrativos foi removido do extrator de Soxhlet e seco em estufa a 65°C até massa constante. O teor de extrativos contido na amostra foi determinado pela média das triplicatas, de acordo com a equação 3.

$$\text{Extrativos (\% m/m)} = \frac{(\text{Massa inicial} - \text{Massa sem extrativos})}{\text{Massa inicial}} \times 100 \quad (3)$$

4.2.4 Determinação de Carboidratos Estruturais e Lignina

Os teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas foram determinados de acordo com metodologia do NREL (*National Renewable Energy Laboratory*).⁸²

Em tubos de ensaio de 25 mm de diâmetro pesou-se 0,2500±0,0015 g de biomassa livre de extrativos e adicionou-se 3,0 mL de solução de ácido sulfúrico 72% (v v⁻¹). Após homogeneização, os tubos foram incubados em banho-maria a 30°C por uma hora, sendo agitados a cada 10 minutos. Terminado o tempo de incubação, o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para erlenmeyer de 125 mL e adicionado a cada frasco 84 mL de água purificada por osmose reversa para diluição do ácido sulfúrico a 4% (v v⁻¹). Os frascos foram autoclavados por uma hora a 121°C e, após resfriados a temperatura ambiente, os hidrolisados foram filtrados em cadinhos de vidro tipo Gooch n° 3 previamente calcinados a 550°C. A fração sólida contida no cadinho foi lavada com água purificada por osmose reversa afim de remover todo o hidrolisado. Os cadinhos contendo as frações sólidas foram secos a 105°C por 24 horas e a massa determinada (W1). Sequencialmente, os cadinhos foram calcinados a 550°C por 5 h e a

massa final determinada (W2). Os teores de lignina insolúvel e cinzas foram calculados de acordo com as equações 4 e 5, respectivamente.

$$\text{Lignina (\% m/m)} = \frac{W_1 - W_2}{\text{massa amostra}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Cinzas (\% m/m)} = \frac{W_2}{\text{massa amostra}} \times 100 \quad (5)$$

Da fração líquida obtida após a filtração retirou-se 1 mL para determinação de lignina ácido solúvel, por espectrofotometria a 280 nm (Genesys 10 UV) (equação 6). O restante do hidrolisado foi neutralizado com hidróxido de cálcio até pH entre 5,5 e 6,0, e filtrado em funil de Büchner lavando o precipitado com água purificada por osmose reversa. O filtrado foi transferido para balão volumétrico de 200 mL e avolumado. As concentrações de glicose e xilose foram determinadas por Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC) com detector de índice de refração (IR) (conforme metodologia descrita em 4.7.1) e os teores de celulose e hemicelulose calculados de acordo com as equações 7 e 8, respectivamente.

$$\text{Lignina sol. (\%)} = \left(\frac{\text{Abs} \times V \times D}{\epsilon \times \text{massa amostra}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Onde:

Abs = absorvância em 280nm;

V = volume de hidrolisado (0,087 L)

D = diluição da amostra

ϵ = absorvância (25 L g⁻¹cm⁻¹)

$$\text{Celulose (\% m/m)} = \frac{0,90}{0,96} \times \text{Conc. glicose} \times \frac{V}{\text{massa amostra}} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

0,90 = Coeficiente que resulta da relação entre massa molecular do polímero e do monômero de glicose;

0,96 = Rendimento de sacarificação

Concentração de glicose (g L⁻¹)

V = Volume total da solução de hidrolisado (L)

$$\text{Hemicelulose (\% m/m)} = \frac{0,88}{0,93} \times \text{Conc. xilose} \times \frac{V}{\text{massa amostra}} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

0,88 = Coeficiente que resulta da relação entre massa molecular do polímero e do monômero de glicose

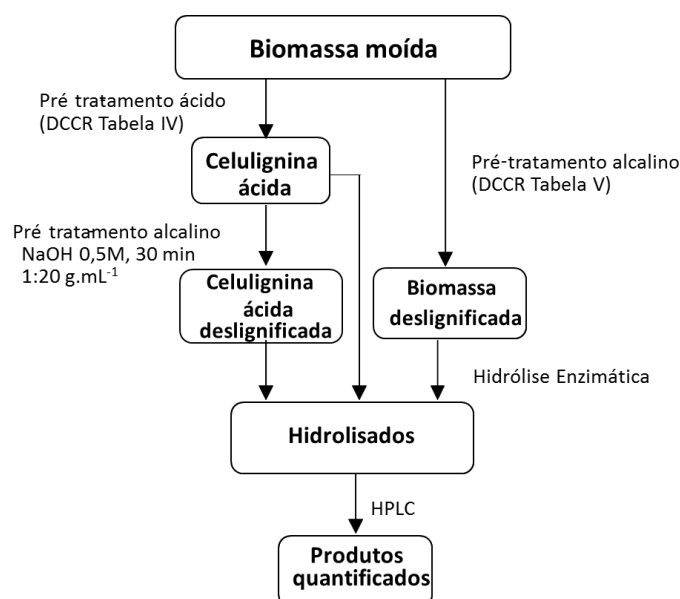
0,93 = Rendimento de sacarificação

Concentração de xilose (g L^{-1})

V = Volume total da solução de hidrolisado (L)

4.3 PRÉ-TRATAMENTO

Com o objetivo de melhorar o rendimento de hidrólise enzimática e da fermentação foi realizado o pré-tratamento químico ácido e alcalino. Para o pré-tratamento ácido, foi utilizado o ácido sulfúrico, em diferentes concentrações, variando de 0,11% a 5,0% v v⁻¹, tempo de 4,8 minutos a 55,2 minutos e relação sólido:líquido de 1:1,7 g mL⁻¹ a 1: 6,6 g mL⁻¹. O pré-tratamento alcalino foi realizado em duas diferentes situações: após o pré-tratamento ácido, utilizando solução de NaOH 0,5 M, relação sólido:líquido 1:20 g mL⁻¹ por 30 minutos a 127°C; e na biomassa integral, sem prévio pré-tratamento ácido, utilizando hidróxido de sódio em concentrações que variaram de 0,3 M a 1,7 M e relação sólido líquido de 1:7,9 a 1:22 g mL⁻¹. A Figura 14 apresenta o fluxograma do processo de pré-tratamento químico da biomassa de arundo.



Fonte: O autor.

Figura 14. Fluxograma do processo de pré-tratamento químico da biomassa de arundo.

4.3.1 Pré-tratamento ácido

As variáveis concentração de ácido sulfúrico, tempo e relação sólido:líquido foram avaliadas através de delineamento composto central rotacional (DCCR), cujos níveis deste planejamento estão apresentados na Tabela IV. Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 , incluído 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios.

A biomassa (100,00 g) foi borrifada com solução de ácido sulfúrico e autoclavada a 120 °C por diferentes períodos de tempos em diferentes relações sólido:líquido, conforme matriz de planejamento experimental (Tabela IV).

Após período de autoclavagem a fração sólida foi separada da fração líquida por filtração e prensagem. As concentrações de glicose e xilose na fração líquida obtida no pré-tratamento foram determinadas por cromatografia a líquido de alta eficiência. A biomassa foi lavada com água e o pH ajustado a 5,0 utilizando solução de NaOH 2% $m v^{-1}$, e a biomassa resultante (celulignina ácida) foi seca em estufa a 65 °C até peso constante, sendo a massa final registrada.

As biomassas resultantes do processo de pré-tratamento ácido nas condições estudadas foram submetidas à hidrólise enzimática a fim de avaliar a concentração de açúcares liberados.

Visando aumentar o rendimento de hidrólise pela remoção de lignina foi realizado o pré-tratamento alcalino da celulignina ácida obtida no planejamento experimental (Tabela IV). Para isto, a biomassa foi tratada com solução de NaOH 0,5 M, relação sólido:líquido 1:20, autoclavada a 127 °C por 30 minutos, e após lavada com água e o pH ajustado a 5,0 com solução de H_2SO_4 2% $v v^{-1}$. A biomassa foi seca em estufa a 65 °C até peso constante e a massa final registrada.

As biomassas resultantes do processo de pré-tratamento ácido seguido do pré-tratamento alcalino foram submetidas à hidrólise enzimática a fim de avaliar a concentração de açúcares liberados.

As concentrações de glicose e xilose foram utilizadas como variáveis resposta no delineamento composto central rotacional, utilizando metodologia de superfície de resposta (MSR) através do *software* Statistica.

Tabela IV. Matriz do planejamento experimental e valores experimentais das variáveis concentração de ácido sulfúrico (% v v⁻¹), tempo (minutos) e relação sólido (S):líquido (L) (g mL⁻¹) no pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L.

Matriz			Valores Experimentais		
Conc. H ₂ SO ₄	Tempo	Relação S:L	Conc. H ₂ SO ₄	Tempo	Relação S:L
1	-1	-1	1,1	15	1:4
2	-1	1	1,1	15	1:2
3	-1	-1	1,1	45	1:4
4	-1	1	1,1	45	1:2
5	1	-1	4,0	15	1:4
6	1	1	4,0	15	1:2
7	1	-1	4,0	45	1:4
8	1	1	4,0	45	1:2
9	-1,68	0	0,11	30	1:3
10	1,68	0	5,0	30	1:3
11	0	-1,68	2,55	4,8	1:3
12	0	1,68	2,55	55,2	1:3
13	0	0	2,55	30	1:1,7
14	0	0	2,55	30	1:6,6
15	0	0	2,55	30	1:3
16	0	0	2,55	30	1:3
17	0	0	2,55	30	1:3

4.3.2Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino foi realizado na biomassa integral de arundo (sem prévio pré-tratamento ácido) com o objetivo de avaliar o efeito da remoção de lignina no rendimento da hidrólise enzimática. As variáveis concentração de hidróxido de sódio e relação sólido:líquido foram avaliadas através de delineamento composto central rotacional (DCCR), cujos níveis deste planejamento estão apresentados na Tabela V. Realizou-se um planejamento fatorial completo 2², incluído 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios.

À biomassa foi adicionada solução de hidróxido de sódio e autoclavada a 127 °C por 30 minutos, conforme matriz de planejamento experimental (Tabela V). Após período de autoclavagem a biomassa foi lavada com água e o pH ajustado a 5,0 com solução de H₂SO₄ 2% v/v. A biomassa resultante foi seca em estufa a 65 °C até peso constante e a massa final registrada.

Tabela V. Matriz do planejamento experimental e valores experimentais das variáveis concentração de hidróxido de sódio (mol L⁻¹) e relação sólido (S):líquido (L) (g mL⁻¹) no pré-tratamento alcalino de *Arundo donax* L.

	Matriz		Valores Experimentais	
	Conc. NaOH	Relação S:L	Conc. NaOH	Relação S:L
1	-1	-1	0,5	1:10
2	1	-1	1,5	1:10
3	-1	1	0,5	1:20
4	1	1	1,5	1:20
5	-1,41	0	0,3	1:15
6	1,41	0	1,7	1:15
7	0	-1,41	1,0	1:7,9
8	0	1,41	1,0	1:22
9	0	0	1,0	1:15
10	0	0	1,0	1:15
11	0	0	1,0	1:15

4.3.3 Hidrólise Enzimática

As biomassas submetidas ao processo de pré-tratamento (ácido; ácido seguido de alcalino, e alcalino) foram hidrolisadas utilizando a enzima Cellic CTec3 (Novozymes) para avaliar a concentração de açúcares liberados e determinar as melhores condições de pré-tratamento da biomassa de arundo.

Dez gramas de biomassas foram previamente autoclavadas a 111°C por 15 minutos em frascos erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se 15 FPU (Unidades de papel filtro) g⁻¹ de enzima diluída em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0 (relação sólido:líquido 1:10 g mL⁻¹) à biomassa. Os frascos foram mantidos por 48 horas em

incubadora com agitação orbital a 50°C e 200 rpm. Coletas de hidrolisados foram realizadas periodicamente durante a etapa de hidrólise para a quantificação dos açúcares liberados.

Ao final do período de hidrólise (48 horas), foram determinadas as concentrações de HMF (5-hidroxiacetilfurfural), furfural e ácido acético.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a correta dosagem de enzima, antes da realização das hidrólises, foram determinadas as atividades enzimáticas.

4.4.1 Atividade enzimática em papel filtro

Em tubos de ensaio contendo 1 mL de tampão citrato 50 mM pH 5,0 foram adicionados um pedaço enrolado de papel filtro Whatmann n°1 de 1X6 cm (50 mg) e 0,5 mL de enzima Cellic Ctec 3 (Novozymes) previamente diluída no mesmo tampão. Além dos tubos de ensaio contendo o substrato (papel filtro) e a enzima, foram conduzidos o controle de enzima (0,5 mL enzima e 1,0 mL tampão) e o controle do substrato (papel filtro e 1,5 mL tampão) além do branco da análise (1,5 mL de tampão). Os tubos foram incubados por 1h a 50°C e então, foram adicionados 3 mL do reagente DNS (ácido dinitrosalicílico) e incubados por 5 minutos a 100°C e resfriados em banho de gelo. Ao final do período de incubação e resfriamento, foram adicionados 20 mL de água purificada por osmose reversa e realizada leitura espectrofotométrica a 540 nm (Bel Photonics 2000UV). A concentração de glicose liberada foi calculada a partir de curva analítica construída utilizando D-Glicose anidra p.a, e a atividade enzimática expressa em unidades de papel filtro (FPU) que corresponde a quantidade de enzima necessária para liberação de 1 μ Mol de açúcares redutores por minuto.⁸³

4.4.2 Atividade enzimática CMCásica

A determinação da atividade CMCásica foi realizada pela adição de 50 μ L de enzima diluída em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 e 50 μ L do substrato carboximetilcelulose (CMC) 2% $m v^{-1}$ em microtubos tipo *Eppendorff*, os quais foram incubados a 50°C durante 15 minutos. Após, foram adicionados 300 μ L de reagente DNS e os tubos incubados a 100°C por 15 minutos. Decorrido o tempo de incubação, os tubos foram resfriados e foram adicionados 1,5 mL de água purificada por osmose reversa e realizada leitura espectrofotométrica a 540 nm (Bel Photonics 2000UV). A

concentração de glicose liberada foi calculada a partir de curva analítica construída utilizando D-Glicose anidra p.a. e a atividade enzimática expressa em unidades internacionais (UI), que corresponde a quantidade de enzima necessária para liberação de 1 μMol de açúcares redutores por minuto.

4.4.3 Atividade enzimática β -glucosidásica

Foram adicionados 50 μL de substrato celobiose 2% m v^{-1} e 50 μL de enzima diluída em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0 em microtubos tipo *Eppendorff*, os quais foram incubados a 50°C durante 15 minutos. Após, os mesmos foram colocados em banho-maria a 100°C por 15 minutos. Utilizando método enzimático glicose oxidase (GOD) a concentração de glicose liberada foi determinada e atividade enzimática expressa em unidades internacionais (UI) que corresponde a quantidade de enzima necessária para liberação de 1 μMol de açúcares redutores por minuto.

4.5 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Após a otimização do pré-tratamento da biomassa foi realizado experimento para avaliação das condições de hidrólise enzimática. As biomassas submetidas ao processo de pré-tratamento nas condições otimizadas foram hidrolisadas utilizando a enzima Cellic CTec3 (Novozymes). As variáveis avaliadas foram carga enzimática e relação sólido:líquido, através de delineamento composto central rotacional (DCCR), cujos níveis deste planejamento estão apresentados na Tabela VI.

As massas das biomassas usadas em cada experimento para a avaliação das condições de hidrólise enzimática foram calculadas de acordo com a relação sólido:líquido apresentada na Tabela VI de modo que o volume final reacional fosse de 100 mL. As biomassas foram previamente autoclavadas a 111°C por 15 minutos em erlenmeyer de 250 mL e a enzima foi diluída em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0. Os frascos foram incubados por 48 horas em incubadora com agitação orbital a 50°C e 200 rpm. As coletas de hidrolisados foram realizadas periodicamente durante a hidrólise para a quantificação dos açúcares liberados. Ao final do período de hidrólise, o conteúdo de cada frasco foi transferido para tubos de centrifuga de 50 mL e centrifugados por 20 minutos a 5000 rpm e o volume de hidrolisado determinado.

As concentrações de glicose e xilose foram utilizadas como variáveis resposta no delineamento composto central rotacional, utilizando metodologia de superfície de resposta (MSR) através do *software* Statistica.

Tabela VI. Matriz do planejamento experimental e valores experimentais da hidrólise enzimática de *Arundo donax* L.

	Matriz		Valores Experimentais	
	Carga Enzimática	Relação S:L	Carga Enzimática	Relação S:L
1	-1	-1	20	1:13
2	1	-1	80	1:13
3	-1	1	20	1:7
4	1	1	80	1:7
5	-1,41	0	7,7	1:10
6	1,41	0	92,3	1:10
7	0	-1,41	50	1:14,2
8	0	1,41	50	1:5,8
9	0	0	50	1:10
10	0	0	50	1:10
11	0	0	50	1:10

As eficiências de hidrólise foram calculadas conforme a equação 9.

$$E.H (\%) = \frac{\text{Conc. açúcar} \times V_f}{1,11 \times m_s \times F_{\text{polissacarídeo}}} \times 100 \quad (9)$$

Onde:

Conc. Açúcar = concentração de glicose ou xilose

V_f = volume final

m_s = massa de substrato

$F_{\text{polissacarídeo}}$ = fração de celulose ou hemicelulose

4.6 FERMENTAÇÕES

4.6.1 Hidrólise e fermentação separadas (SHF)

A fermentação dos hidrolisados (30 mL) foi realizada a 37°C em frascos erlenmeyer de 250 mL incubados em incubadora com agitação orbital a 200 rpm, utilizando levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* seca (8,0 g L⁻¹), inoculada ao meio contendo ureia (1,25 g L⁻¹), KH₂PO₄ (1,1 g L⁻¹), extrato de levedura (2,0 g L⁻¹) e

solução de sais (40 mL) contendo $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($12,5 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,25 \text{ g L}^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,9 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($0,025 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,025 \text{ g L}^{-1}$), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,035 \text{ g L}^{-1}$), H_3BO_3 ($0,050 \text{ g L}^{-1}$), KI ($0,009 \text{ g L}^{-1}$), $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ($0,0125 \text{ g L}^{-1}$), Ácido cítrico ($12,5 \text{ g L}^{-1}$).⁸⁴ A determinação das concentrações de glicose, xilose, celobiose e etanol foram determinados por HPLC - IR.

4.6.2 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

Os experimentos de sacarificação e fermentação simultâneas foram realizados com etapa de pré-hidrólise da biomassa pré-tratada para a liberação de glicose. Após 18 horas de pré-hidrólise, a levedura foi adicionada para o início da fermentação sendo que, com o objetivo de elevar rendimentos, o processo SSF foi conduzido em batelada alimentada, com duas adições de biomassa pré-tratada após o início da fermentação, conforme descrito a seguir.

As biomassas foram pesadas e autoclavadas por 15 minutos a 111°C e as fermentações realizadas em frascos *erlenmeyer* de 1 L. Foram adicionados às biomassas tampão citrato de sódio 25 mM pH 5,0 contendo ureia ($1,25 \text{ g L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($1,1 \text{ g L}^{-1}$), extrato de levedura ($2,0 \text{ g L}^{-1}$) e solução de sais (40 mL) de composição descrita no item 4.6.1. A enzima diluída no mesmo tampão foi adicionada e a pré-hidrólise conduzida a 50°C , 200 rpm, por 18 horas. Após decorrido o período de pré-hidrólise, a temperatura foi reduzida a 37°C e a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* seca ($8,0 \text{ g L}^{-1}$) adicionada. Decorridas 22 e 46 horas da adição da levedura foram acrescentadas ao meio reacional quantidade de biomassa pré-tratada correspondente à metade da massa inicial de biomassa. As condições testadas para SSF da biomassa estão apresentadas na Tabela VII.

Tabela VII. Massa inicial, carga enzimática na pré-hidrólise e carga de sólidos na fermentação de biomassa pré-tratada de arundo.

	Massa inicial (g)	Relação S:L (g mL ⁻¹)	Carga enzimática (FPU g ⁻¹)	Carga de sólidos* (g L ⁻¹)
SSF1	20	1:13	20	160
SSF2	25	1:10	25	200
SSF3	40	1:5,8	50	320

* a carga de sólidos corresponde a massa total (biomassa inicial mais duas adições de biomassa cada uma correspondente a metade da massa inicial).

4.6.3 Cálculos de Rendimentos de Fermentações

Para ambos os processos de fermentação foram calculados:

- ✓ Fator de rendimento de produção de etanol ($Y_{P/S}$) – Equação 10
- ✓ Eficiência de Fermentação (E.F %) – Equação 11
- ✓ Produtividade volumétrica em etanol (Q_P) – Equação 12
- ✓ Redução percentual de substrato (RPS%) – Equação 13
- ✓ Eficiência de conversão de celulose a etanol (ECC%) – Equação 14

$$\left(\frac{Y_P}{S}\right) = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)} \quad (10)$$

$$E.F (\%) = \frac{Y_{P/S}}{0,5111} \times 100 \quad (11)$$

$$Q_P = \frac{(P - P_0)}{T_f} \quad (12)$$

$$RPS (\%) = \frac{S - S_0}{S_0} \times 100 \quad (13)$$

$$ECC (\%) = \frac{P}{(CC \times 1,1) \times 0,511} \times 100 \quad (14)$$

Onde:

P e P_0 = concentração etanol final e inicial

S e S_0 = concentração glicose final e inicial

T_f = tempo de fermentação

CC = concentração de celulose

4.7 ANÁLISE DOS PRODUTOS POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

4.7.1 Análise de açúcares, ácido acético e etanol

As análises foram realizadas por HPLC em equipamento SHIMADZU modelo 20A, equipado com detector de índice de refração e coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad), e H₂SO₄ 5 mM como fase móvel (0,6mL min⁻¹). As condições de análise foram: injeção de 20 µL, temperatura do detector a 40°C e temperatura do forno a 45 °C.

4.7.2 Análise de 5 - hidroximetilfurfural e furfural

As análises foram realizadas por HPLC em equipamento SHIMADZU modelo 20A, equipado com detector de arranjo de diodos e coluna C18 (Supelco), e como fase móvel utilizou-se mistura de água, acetonitrila e ácido acético (79:20:1) (1,1mL min⁻¹). As condições de análise foram: injeção de 20 µL, e comprimento de onda de 276 nm.

4.7.3 Determinação dos limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos analitos foram calculados pelo software *LC-Solutions* a partir do valor do ruído da linha de base dos cromatogramas dos pontos da reta das curvas de calibração. Para o limite de detecção foi estabelecido a relação sinal-ruído de 3:1 e para o limite de quantificação a relação sinal-ruído foi de 10:1.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Delineamento experimental composto rotacional (DCCR) foi utilizado para avaliar a influência das variáveis nos pré-tratamentos ácido e alcalino e na hidrólise enzimática, utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR). As variáveis dependentes concentração de glicose e xilose foram analisadas utilizando o *software* STATISTICA 12.0 (StatSoft, Inc.). Para verificar as diferenças nos pré-tratamentos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a ao teste de Tukey a 95% de significância ($p \leq 0.05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

O tratamento físico da biomassa para a redução do tamanho de partícula é a primeira etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica e tem como objetivo aumentar a área superficial e reduzir a cristalinidade e o grau de polimerização.^{2, 85, 86} A Figura 15 apresenta a biomassa após o processo de secagem (A) e após a segunda etapa de redução do tamanho de partícula (B).



Figura 15. Biomassa de arundo coletada no município de Pelotas/RS após secagem (A) e após moagem em moinho de facas (B).

O tamanho de partícula é uma característica importante no uso de biomassas lignocelulósicas para a produção de etanol, pois pode ter influência na digestibilidade da biomassa.⁸⁷ A Tabela VIII apresenta a distribuição do tamanho de partícula da biomassa de arundo utilizada neste estudo, após as etapas de secagem e moagem.

As maiores frações da biomassa compreendem partículas maiores que 0,50 mm, enquanto que partículas menores que 0,5 mm representam 28,5% da massa média total.

Biomassas lignocelulósicas são compostas basicamente de celulose, hemicelulose e lignina.^{2,62,88,89} A Tabela IX apresenta a composição química da biomassa de *Arundo donax* L. coletada no município de Pelotas/RS.

Tabela VIII. Análise granulométrica da biomassa de *Arundo donax* L.

Abertura peneira (mm)	Massa retida (%)
1,00	39,5 ± 5,25
0,50	31,8 ± 2,21
0,25	17,5 ± 4,27
0,105	7,5 ± 4,11
0,053	2,3 ± 1,55
< 0,053	1,2 ± 0,5

Tabela IX. Composição química da biomassa de *Arundo donax* L.

Componentes	Biomassa Arundo (%m/m)
Umidade	1,68 ± 0,31
Extrativos	14,68 ± 0,53
Celulose	33,3 ± 4,4
Hemicelulose	14,6 ± 2,3
Lignina solúvel	10,8 ± 0,32
Lignina insolúvel	19,6 ± 0,44
Cinzas	3,6 ± 0,33

Corno et al. (2014)¹² apresentaram resultados da composição química de arundo obtidos por diferentes autores que variam de 11,2% a 21,6% de extrativos, 29,2% a 39,1% de celulose, 14,5% a 32,0% de hemicelulose, 19,2% a 24,3% de lignina e 4,2% a 6,1% de cinzas. Lemons e Silva et al. (2014)¹¹ determinaram 31,1% de celulose, 35,3% de hemicelulose e 18,5% de lignina em biomassa de arundo coletada no município de Pelotas/RS.

Sun e Cheng (2002)⁵⁸ e Anwar et al. (2014)²⁷ relatam que o teor de lignina em gramíneas varia de 10% a 30%. No presente estudo (Tabela IX) os teores de extrativos, celulose e hemicelulose estão dentro da faixa relatada na literatura. O teor de lignina total (30,4%) determinado foi superior e o teor de cinzas inferior aos apresentados pelos autores.

A composição química e as propriedades físico-químicas influenciam a conversão da biomassa lignocelulósica em etanol o que torna essencial a otimização dos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática para viabilização do processo.³⁶

5.2 PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO

5.2.1 Pré-tratamento ácido

5.2.1.1 Efeito do pré-tratamento ácido no pré-hidrolisado

Pré-tratamentos químicos são muito utilizados para o aproveitamento de biomassas lignocelulósicas. Ácidos diluídos ou concentrados hidrolisam a fração hemicelulósica de grande parte das matérias primas lignocelulósicas facilitando o acesso à celulose e conseqüentemente aumentando os rendimentos de hidrólise da biomassa.^{23, 27, 29}

As concentrações de glicose e xilose da fração líquida (pré-hidrolisado), obtida após o pré-tratamento da biomassa, e de ajuste de pH para 6,0, determinadas por HPLC - IR se encontram na Tabela X.

Nos dezessete ensaios realizados, a concentração de glicose variou de 0,2 g L⁻¹ a 2,1 g L⁻¹, sendo a concentração de xilose maior do que a concentração de glicose em todos os ensaios, variando de 0,7 g L⁻¹ a 6,4 g L⁻¹. As maiores concentrações de glicose (2,1 g L⁻¹) e xilose (6,4 g L⁻¹) foram obtidas no ensaio 8, que corresponde a maior concentração de ácido sulfúrico (4,0%), maior tempo (45 minutos) e relação sólido:líquido 1:2 g mL⁻¹.

A utilização de ácidos diluídos em pré-tratamentos de diferentes biomassas lignocelulósicas tem mostrado eficiência na recuperação de açúcares pela hidrólise de hemiceluloses e aumento da acessibilidade à celulose.^{2,58, 62}

Tabela X. Valores experimentais e variáveis resposta concentração de glicose, xilose e somatório obtidos no pré-hidrolisado do planejamento experimental do pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L.

Valores Experimentais				Variáveis Resposta		
	Conc. H ₂ SO ₄	Tempo	Relação S:L	Concentrações (g L ⁻¹)		
				Glicose	Xilose	Soma
1	1,1	15	1:4	0,7	1,1	1,8
2	1,1	15	1:2	0,6	0,9	1,5
3	1,1	45	1:4	0,8	2,2	3,0
4	1,1	45	1:2	0,8	1,5	2,3
5	4,0	15	1:4	1,2	3,4	4,6
6	4,0	15	1:2	1,6	4,5	6,1
7	4,0	45	1:4	1,3	3,9	5,2
8	4,0	45	1:2	2,1	6,4	8,5
9	0,11	30	1:3	0,25	0,75	1,0
10	5,0	30	1:3	1,7	5,0	6,7
11	2,55	4,8	1:3	0,4	0,8	1,2
12	2,55	55,2	1:3	1,4	4,2	5,6
13	2,55	30	1:1,7	0,2	0,7	0,9
14	2,55	30	1:6,6	0,8	2,4	3,2
15	2,55	30	1:3	1,4	3,9	5,3
16	2,55	30	1:3	1,4	3,9	5,3
17	2,55	30	1:3	1,3	3,6	4,9

S = sólido; L = líquido

A Tabela XI apresenta a estimativa dos efeitos das três variáveis para a concentração de glicose. A concentração de ácido sulfúrico e o tempo de pré-tratamento apresentaram efeito positivo significativo ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para a concentração de glicose nos pré-hidrolisados. Já a relação sólido:líquido e os termos quadráticos da concentração de ácido sulfúrico e do tempo não apresentaram efeito significativo, assim como as interações entre as variáveis.

Tabela XI. Estimativa dos efeitos para concentração de glicose obtidos no pré-hidrolisado do planejamento experimental do pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor
Média	1,34	0,17	7,94	0,0001
(x ₁) Conc. H ₂ SO ₄ (L)	0,84	0,16	5,30	0,0011
Conc. H ₂ SO ₄ (Q)	-0,11	0,17	-0,61	0,5598
(x ₂) Tempo (L)	0,38	0,16	2,38	0,0488
Tempo (Q)	-0,16	0,17	-0,92	0,3902
(x ₃)Relação sólido:líquido (L)	0,31	0,16	1,95	0,0927
Relação sólido:líquido (Q)	-0,44	0,17	-2,54	0,0389
x ₁ x ₂	0,08	0,21	0,36	0,7282
x ₁ x ₃	0,32	0,21	1,57	0,1610
x ₂ x ₃	0,12	0,21	0,60	0,5656

As Figuras 16 e 17 apresentam as superfícies de respostas da concentração de glicose em função das variáveis analisadas.

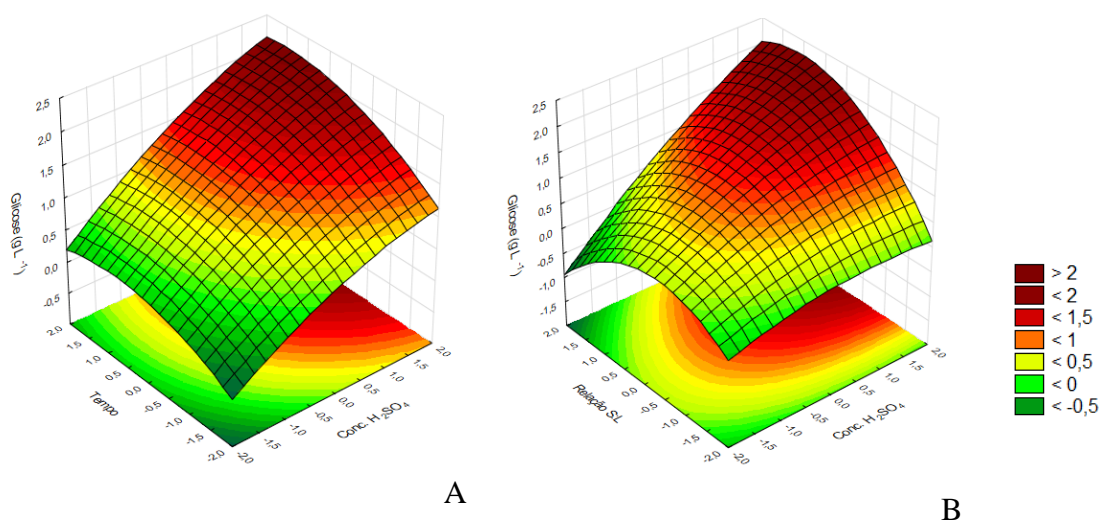


Figura 16. Superfície de resposta para concentração de glicose (g L^{-1}) em função da concentração de H_2SO_4 e do tempo (A) e superfície de resposta para concentração de glicose (g L^{-1}) em função da concentração de H_2SO_4 e da relação sólido:líquido (B).

É possível verificar na Figura 16A o aumento da concentração de glicose com o aumento da concentração de ácido sulfúrico e com o aumento do tempo, variáveis que

tiveram efeito significativo. Assim como na Figura 16B o aumento da concentração de ácido sulfúrico e a diminuição da relação sólido:líquido (aumento do volume de solução ácida) permitiram maior liberação de glicose para a fração líquida.

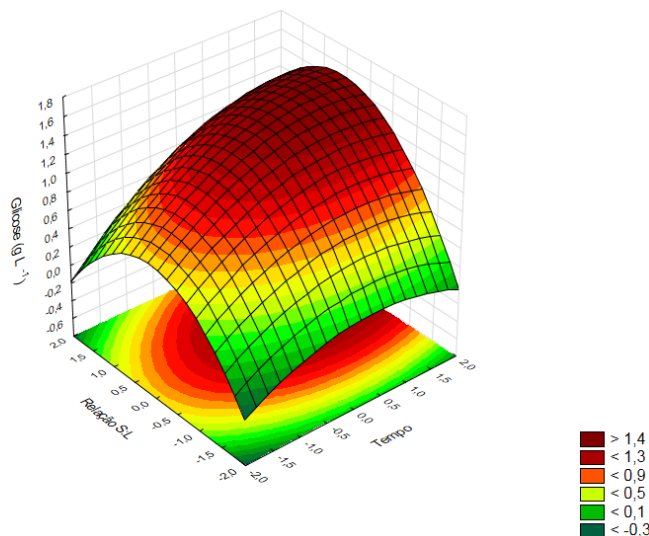


Figura 17. Superfície de resposta para concentração de glicose (g L⁻¹) no pré-hidrolisado, em função da relação sólido:líquido e do tempo.

Na Figura 17 observa-se a variação da concentração de glicose em função do tempo e da relação sólido:líquido. As maiores concentrações de glicose são obtidas em intervalos de tempos superiores à 30 minutos, correspondente ao intervalo de tempo médio do experimento.

As Figuras 16 e 17 indicam ainda que, com o aumento dos níveis das variáveis que apresentaram efeito significativo, concentração de ácido sulfúrico e tempo, pode-se obter concentrações maiores de glicose no pré-hidrolisado. Esta avaliação pode ser interessante para futuros trabalhos com o uso de açúcares da hemicelulose para a produção de biocombustíveis e produtos químicos.

A concentração de xilose também foi utilizada como variável resposta no planejamento experimental do pré-tratamento da biomassa de *Arundo donax* L. A Tabela XII apresenta a estimativa dos efeitos das variáveis analisadas. Assim como para a concentração de glicose, as variáveis concentração de H₂SO₄ e tempo apresentaram efeito positivo significativo na concentração de xilose.

A variável relação sólido:líquido, os termos quadráticos da concentração de ácido sulfúrico e do tempo e as interações entre as variáveis não apresentaram efeito significativo ao nível de significância de 5%.

Tabela XII. Estimativa dos efeitos para concentração de xilose obtidos no pré-hidrolisado do planejamento experimental do pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor
Média	3,75	0,41	9,04	0,00004
(x ₁) Conc. H ₂ SO ₄ (L)	2,88	0,39	7,39	0,0002
Conc. H ₂ SO ₄ (Q)	-0,31	0,43	-0,72	0,4928
(x ₂) Tempo (L)	1,44	0,39	3,69	0,0077
Tempo (Q)	-0,58	0,43	-1,34	0,2212
(x ₃)Relação sólido:líquido (L)	0,81	0,39	2,09	0,0749
Relação sólido:líquido (Q)	-1,25	0,43	-2,91	0,0226
x ₁ x ₂	0,18	0,51	0,34	0,7409
x ₁ x ₃	1,12	0,51	2,21	0,0627
x ₂ x ₃	0,22	0,51	0,44	0,6716

As Figuras 18 e 19 apresentam as superfícies de respostas para a concentração de xilose em função das variáveis analisadas. Na Figura 18, A e B, observa-se para a concentração de xilose comportamento similar à concentração de glicose (Figura 16 A e B), aumento da concentração de xilose com o aumento da concentração de ácido sulfúrico e do tempo (Figura 18 A), bem como da relação sólido:líquido (Figura 18 B), tal como ilustrado na Figura 19.

As Figuras 18 e 19 indicam também que o aumento dos níveis das variáveis poderá aumentar a concentração de xilose no pré-hidrolisado (fração líquida do pré-tratamento). Este comportamento só poderá ser verificado com a realização de novos experimentos, os quais não foram realizados pois foi mantido o foco do trabalho no uso da biomassa para a produção de etanol. A determinação dos açúcares nos pré-hidrolisados foi realizada com o objetivo de quantificar os açúcares que foram solubilizados durante o pré-tratamento.

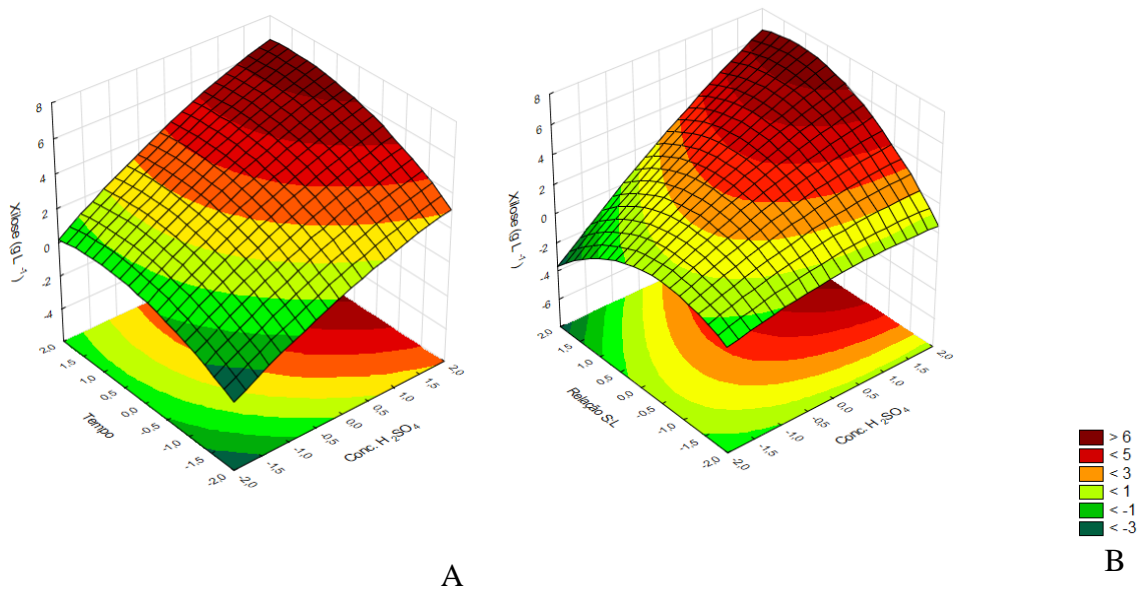


Figura 18. Superfície de resposta para concentração de xilose (g L^{-1}) em função da concentração de H_2SO_4 e do tempo (A) e superfície de resposta para concentração de xilose (g L^{-1}) em função da concentração de H_2SO_4 e da relação sólido:líquido (B).

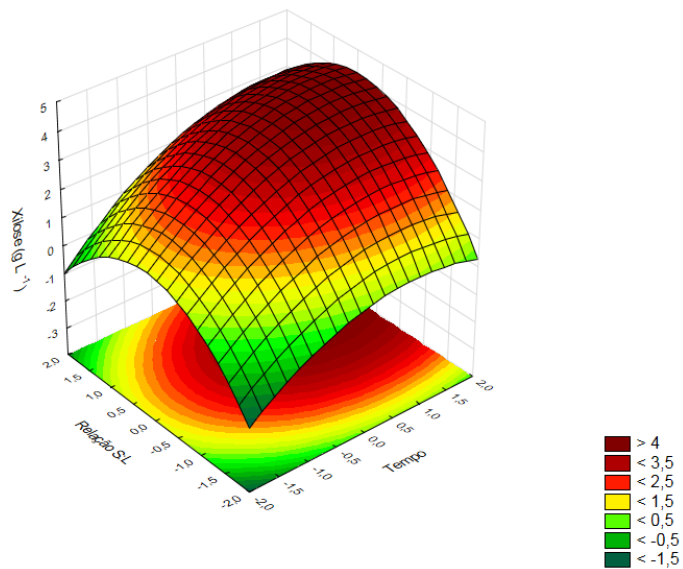


Figura 19. Superfície de resposta para concentração de xilose (g L^{-1}) em função da relação sólido:líquido e do tempo.

5.2.1.2 Efeito do pré-tratamento ácido na fração sólida da biomassa

Após o pré-tratamento, a biomassa resultante foi lavada até pH 4,5 – 5,0 e seca. A massa obtida após pré-tratamento foi registrada. Dez gramas da biomassa de cada pré-tratamento foram submetidos à hidrólise enzimática. As concentrações de glicose e xilose nos hidrolisados foram determinadas por HPLC-IR e estão apresentadas na Tabela XIII.

Tabela XIII. Valores experimentais, perda de massa e variáveis resposta concentração de glicose, xilose e somatório obtidos no planejamento experimental do pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L.

Valores Experimentais				Perda de Massa (%m/m)	Variáveis Resposta		
Conc. H ₂ SO ₄	Tempo	Relação S:L	Concentrações (g L ⁻¹)				
				Glicose	Xilose	Soma	
1	1,1	15	1:4	30,82	10,4	2,7	13,1
2	1,1	15	1:2	24,88	8,3	2,8	11,1
3	1,1	45	1:4	36,23	12,5	2,8	15,3
4	1,1	45	1:2	27,15	10,5	3,1	13,6
5	4,0	15	1:4	42,03	15,4	2,8	18,2
6	4,0	15	1:2	39,60	13,3	2,9	16,2
7	4,0	45	1:4	49,64	19,1	2,2	21,3
8	4,0	45	1:2	46,99	16,6	2,4	19,0
9	0,11	30	1:3	18,14	6,2	1,8	8,0
10	5,0	30	1:3	45,89	13,3	1,9	15,2
11	2,55	4,8	1:3	22,83	15,4	2,5	17,9
12	2,55	55,2	1:3	45,65	15,5	2,6	18,1
13	2,55	30	1:1,7	40,05	10,8	2,5	13,3
14	2,55	30	1:6,6	45,92	13,7	2,2	15,9
15	2,55	30	1:3	40,77	11,8	2,6	14,4
16	2,55	30	1:3	41,54	12,7	2,8	15,5
17	2,55	30	1:3	41,36	12,6	2,6	15,2

A perda de massa nos ensaios de pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L. variou de 18,14% a 49,64%. A menor perda de massa foi obtida no ensaio com a menor concentração de ácido sulfúrico (0,11% v v⁻¹). Já a maior perda de massa foi obtida no ensaio 7 utilizando 4,0% de ácido sulfúrico por 45 minutos e relação sólido:líquido 1:4 g mL⁻¹.

Assim como a perda de massa, a maior concentração de glicose (19,1 g L⁻¹) também foi obtida com 4,0% de ácido sulfúrico por 45 minutos e a menor (6,2 g L⁻¹) com a menor concentração de ácido sulfúrico (0,11% v v⁻¹).

Para a concentração de xilose observou-se o mesmo comportamento da perda de massa e da concentração de glicose para o menor valor obtido (1,8 g L⁻¹), porém a maior concentração de xilose (3,1 g L⁻¹) foi obtida com 1,1% de ácido sulfúrico por 45 minutos e relação sólido:líquido 1:2 g mL⁻¹.

A concentração média de glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática foram 12,8 g L⁻¹ e 2,5 g L⁻¹, respectivamente, sendo a concentração média total igual a 15,4 g L⁻¹ de açúcares disponíveis para a fermentação. Lemons e Silva et al. (2015)¹¹ obtiveram 13,9 g L⁻¹ de glicose a partir da biomassa de arundo pré-tratada com ácido sulfúrico (1,1% v v⁻¹), relação sólido:líquido 1:2,8 g mL⁻¹ por 30 minutos a 120°C.

Foram determinados também a concentração de produtos de degradação nos hidrolisados, os quais são inibidores do processo fermentativo. Na Tabela XIV estão apresentadas as concentrações de HMF, furfural e ácido acético nos hidrolisados.

A concentração de HMF e furfural foi de 0,01 g L⁻¹ em todos os ensaios. Scordia et al. (2011)¹³ encontraram maiores concentrações (0,21 g L⁻¹ a 0,96 g L⁻¹) de HMF em hidrolisados de arundo após pré-tratamento a vapor com ácido oxálico. Já as concentrações de furfural variaram de 1,84 g L⁻¹ a 6,96 g L⁻¹, porém cabe salientar que as maiores concentrações de obtidas por Scordia et al. (2011)¹³ foram determinadas no pré-hidrolisado e não no hidrolisado enzimático.

A concentração de ácido acético variou de 0,4 a 0,5 g L⁻¹ nos ensaios de 1 a 6 e 15 a 16, nos demais ensaios não foram detectados o analito.

Tabela XIV. Concentrações de 5-hidroximetilfurfural (HMF), furfural e ácido acético obtidos na hidrólise enzimática da biomassa após pré-tratamento ácido de *Arundo donax* L.

	Conc. H ₂ SO ₄	Tempo	Relação S:L	Concentrações (g L ⁻¹)		
				HMF	Furfural	Ácido acético
1	1,1	15	1:4	0,01	0,01	0,5
2	1,1	15	1:2	0,01	0,01	0,5
3	1,1	45	1:4	0,01	0,01	0,5
4	1,1	45	1:2	0,01	0,01	0,5
5	4,0	15	1:4	0,01	0,01	0,4
6	4,0	15	1:2	0,01	0,01	0,4
7	4,0	45	1:4	0,01	0,01	nd
8	4,0	45	1:2	0,01	0,01	nd
9	0,11	30	1:3	0,01	0,01	nd
10	5,0	30	1:3	0,01	0,01	nd
11	2,55	4,8	1:3	0,01	0,01	nd
12	2,55	55,2	1:3	0,01	0,01	nd
13	2,55	30	1:1,67	0,01	0,01	nd
14	2,55	30	1:6,6	0,01	0,01	nd
15	2,55	30	1:3	0,01	0,01	0,4
16	2,55	30	1:3	0,01	0,01	0,4
17	2,55	30	1:3	0,01	0,01	nd

LD = 0,007 g L⁻¹; LQ = 0,022 g L⁻¹

5.2.1.3 Pré-tratamento ácido seguido de pré-tratamento alcalino

As baixas concentrações de glicose e xilose obtidas na hidrólise da biomassa pré-tratada apenas com ácido sulfúrico (Tabela XIII) indicam a necessidade de uma etapa adicional para o pré-tratamento. Lemons e Silva et al. (2014)¹¹ obtiveram concentrações de até 42,0 g L⁻¹ de glicose a partir de biomassa de arundo pré-tratada com 1,1% de H₂SO₄, relação sólido:líquido 1:2,8 g mL⁻¹ por 30 minutos seguido de pré-tratamento alcalino.

As biomassas secas obtidas no pré-tratamento ácido foram submetidas então ao pré-tratamento alcalino com 0,5 M NaOH, relação sólido:líquido 1:20 g mL⁻¹ por 30 minutos a 127°C. Após lavagem da biomassa e ajuste do pH, a biomassa seca foi hidrolisada nas mesmas condições já descritas.

A Tabela XV apresenta a perda de massa e as concentrações de glicose e xilose no hidrolisado após as duas etapas de pré-tratamento.

Tabela XV. Valores experimentais, perda de massa (% m m⁻¹) e variáveis resposta concentração de glicose, xilose, celobiose, HMF e furfural obtidos no planejamento experimental do pré-tratamento ácido seguido de pré-tratamento alcalino de *Arundo donax* L.

	Conc. H ₂ SO ₄	Tempo	Relação S:L	Perda de Massa	Concentrações (g L ⁻¹)				
					Glicose	Xilose	Celobiose	HMF	Furfural
1	1,1	15	1:4	53,78	52,6	8,4	0,4	nd	0,01
2	1,1	15	1:2	52,03	51,1	13,0	0,5	nd	0,01
3	1,1	45	1:4	53,4	56,8	4,8	0,3	nd	0,01
4	1,1	45	1:2	52,69	53,1	9,5	0,5	nd	0,01
5	4,0	15	1:4	51,64	41,1	2,5	0,2	nd	0,01
6	4,0	15	1:2	54,57	45,4	3,1	0,4	nd	0,01
7	4,0	45	1:4	55,11	33,8	0,8	0,2	nd	0,01
8	4,0	45	1:2	50,45	36,2	1,4	0,3	0,01	0,01
9	0,11	30	1:3	50,39	49,1	17,1	1,5	nd	0,01
10	5,0	30	1:3	50,67	33,2	1,5	0,2	0,01	0,01
11	2,55	4,8	1:3	53,75	53,8	14,2	0,7	0,01	0,01
12	2,55	55,2	1:3	50,90	38,9	1,7	0,2	nd	0,01
13	2,55	30	1:1,67	52,15	53,8	3,5	0,6	0,01	0,01
14	2,55	30	1:6,6	51,05	38,0	1,6	0,4	nd	0,01
15	2,55	30	1:3	52,17	49,7	3,0	0,7	0,01	0,01
16	2,55	30	1:3	53,36	47,2	3,0	0,6	0,01	0,01
17	2,55	30	1:3	50,76	44,8	2,8	0,6	0,01	0,01

S = sólido; L= Líquido

A perda de massa média após a adição do pré-tratamento alcalino foi de 52,29% variando de 50,39% a 55,11%. A adição do pré-tratamento permitiu maior rendimento de hidrólise enzimática sendo que a concentração de glicose variou de 33,2 g L⁻¹ a 56,8 g L⁻¹. A concentração média de glicose (45,8 g L⁻¹) foi 3,5 vezes superior à concentração média de glicose obtida na hidrólise da biomassa apenas com o pré-tratamento ácido (12,83 g L⁻¹). A utilização de bases como o hidróxido de sódio atua na remoção parcial da lignina aumentando a acessibilidade da enzima à celulose e consequentemente aumentando os rendimentos de hidrólise.^{11,90}

A concentração de glicose foi maior em todos os ensaios com a adição da segunda etapa de pré-tratamento em relação ao pré-tratamento apenas com ácido sulfúrico (etapa única de pré-tratamento). O mesmo comportamento não foi observado para a concentração de xilose que variou de 0,8 g L⁻¹ a 17,1 g L⁻¹, utilizando as duas etapas de pré-tratamento da biomassa.

A concentração média de celobiose foi de 0,5 g L⁻¹, variando de 0,2 a 1,50 g L⁻¹, sendo a maior concentração obtida no ensaio 9, correspondente a menor concentração de ácido sulfúrico.

A determinação de produtos de degradação que podem ser formados durante o pré-tratamento é fundamental para evitar perdas nos rendimentos de fermentação. As concentrações de HMF e furfural nos hidrolisados obtidos após as duas etapas de pré-tratamento estão apresentadas na Tabela XV.

Não foi detectado HMF nos ensaios de 1 a 7, 9, 12 e 14. Nos demais ensaios a concentração de HMF foi de 0,01 g L⁻¹. Em todos os ensaios a concentração de furfural foi de 0,01 g L⁻¹. As baixas concentrações de HMF e furfural indicam que as variáveis não tiveram influência nas condições testadas. Ácido acético não foi detectado em nenhum dos ensaios do planejamento experimental quando o pré-tratamento alcalino foi realizado (LD = 0,007 g L⁻¹; LQ = 0,022 g L⁻¹).

A Tabela XVI apresenta a estimativa dos efeitos das variáveis resposta analisadas na concentração de glicose após a adição do pré-tratamento alcalino.

Apenas a concentração de ácido sulfúrico no pré-tratamento ácido teve efeito negativo significativo após o pré-tratamento alcalino. As demais variáveis e as interações entre elas não apresentaram efeito significativo na concentração de glicose.

O efeito negativo da concentração de ácido pode ser observado nas Figuras 20 e 21, onde as regiões de coloração vermelha indicam as maiores concentrações de glicose

e correspondem aos pontos de menor concentração de ácido sulfúrico em menores tempos e menores relação sólido:líquido (maior volume de solução ácida).

Tabela XVI. Estimativa dos efeitos para concentração de glicose obtidos na hidrólise da biomassa após o pré-tratamento ácido seguido de pré-tratamento alcalino de *Arundo donax* L.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor
Média	47,10	2,71	17,35	0,000001
(x ₁) Conc. H ₂ SO ₄ (L)	-12,28	2,55	-4,82	0,0019
Conc. H ₂ SO ₄ (Q)	-3,43	2,81	-1,22	0,2616
(x ₂) Tempo (L)	-5,18	2,55	-2,03	0,0819
Tempo (Q)	0,25	2,81	0,09	0,9308
(x ₃)Relação sólido:líquido (L)	-3,67	2,55	-1,44	0,1934
Relação sólido:líquido (Q)	-0,06	2,81	-0,02	0,9820
x ₁ x ₂	-5,68	3,33	-1,70	0,1323
x ₁ x ₃	2,98	3,33	0,89	0,4016
x ₂ x ₃	-1,02	3,33	-0,31	0,7673

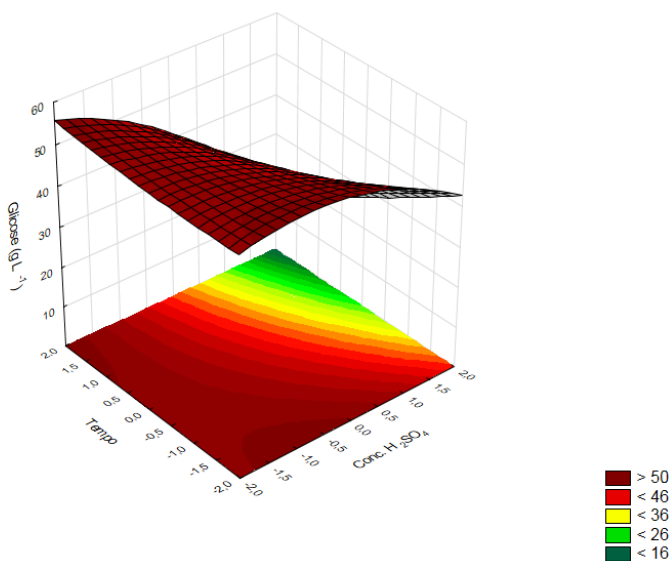


Figura 20. Superfície de resposta para concentração de glicose (g L⁻¹) em função da concentração de ácido sulfúrico e do tempo.

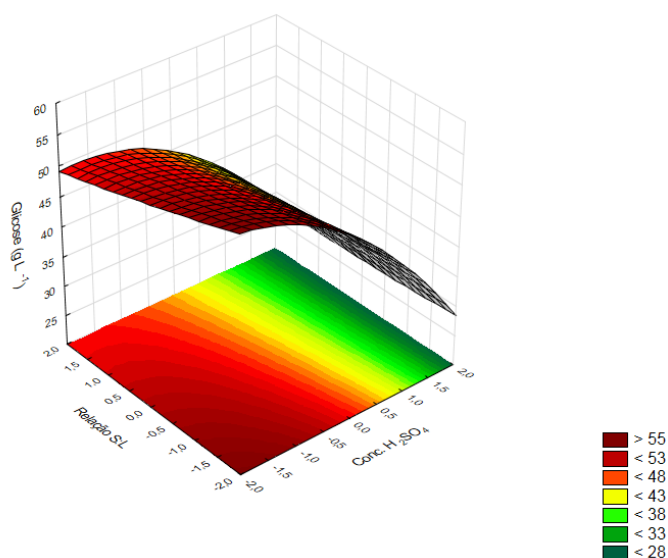


Figura 21. Superfície de resposta para concentração de glicose (g L^{-1}) em função da relação sólido:líquido e da concentração de ácido sulfúrico.

A Tabela XVII apresenta a estimativa dos efeitos das variáveis analisadas na concentração de xilose após a adição do pré-tratamento alcalino. A concentração de ácido sulfúrico e o tempo apresentaram efeito negativo significativo na concentração de xilose após as duas etapas de pré-tratamento da biomassa de arundo. A relação sólido:líquido e as interações entre as variáveis não apresentaram efeito significativo nos rendimentos da hidrólise. As Figuras 22, 23 e 24 apresentam o efeito das variáveis concentração e tempo, concentração e relação sólido:líquido e tempo e relação sólido:líquido, respectivamente.

As Figuras 20, 21, 22, 23 e 24 indicam que o deslocamento para níveis menores da concentração de ácido sulfúrico poderá aumentar a concentração de glicose e xilose liberadas da biomassa pré-tratada após a hidrólise enzimática.

A concentração de ácido sulfúrico e o tempo de pré-tratamento alteram a estrutura da biomassa, sendo necessária a otimização das condições de pré-tratamento para que se obtenha menor perda de açúcares no pré-tratamento e maior concentração de açúcares liberados na hidrólise enzimática.

Tabela XVII. Estimativa dos efeitos para concentração de xilose obtidos na hidrólise da biomassa após o pré-tratamento ácido seguido de pré-tratamento alcalino de *Arundo donax* L.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(7)	p-valor
Média	3,03	1,40	2,16	0,0678
(x ₁) Conc. H ₂ SO ₄ (L)	-7,93	1,32	-6,02	0,0005
Conc. H ₂ SO ₄ (Q)	3,89	1,45	2,68	0,0316
(x ₂) Tempo (L)	-4,62	1,32	-3,50	0,0099
Tempo (Q)	2,93	1,45	2,02	0,0831
(x ₃)Relação sólido:líquido (L)	1,07	1,32	0,81	0,4431
Relação sólido:líquido (Q)	-0,89	1,45	-0,68	0,5578
x ₁ x ₂	0,92	1,72	0,58	0,6076
x ₁ x ₃	-2,02	1,72	-1,18	0,2778
x ₂ x ₃	0,025	1,72	0,01	0,9888

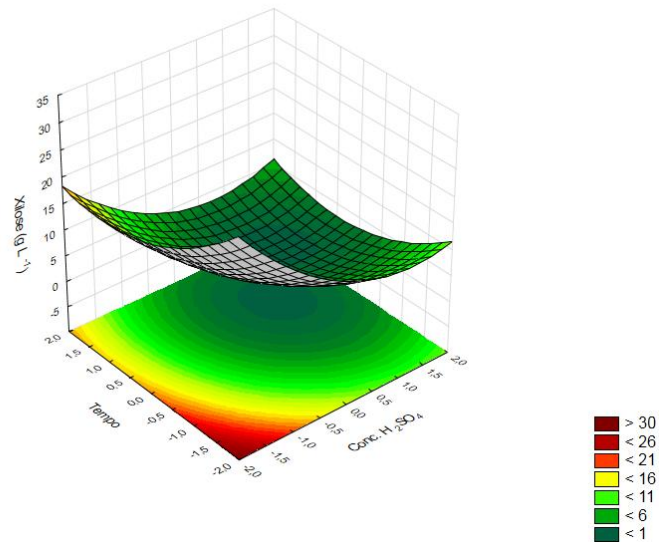


Figura 22. Superfície de resposta para concentração de xilose (g L^{-1}) em função da concentração de ácido sulfúrico e do tempo.

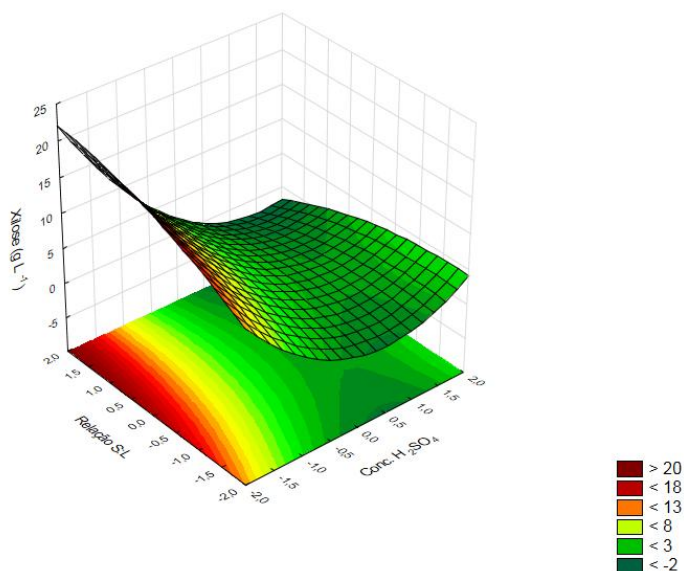


Figura 23. Superfície de resposta para concentração de xilose (g L^{-1}) em função da concentração de ácido sulfúrico e da relação sólido:líquido.

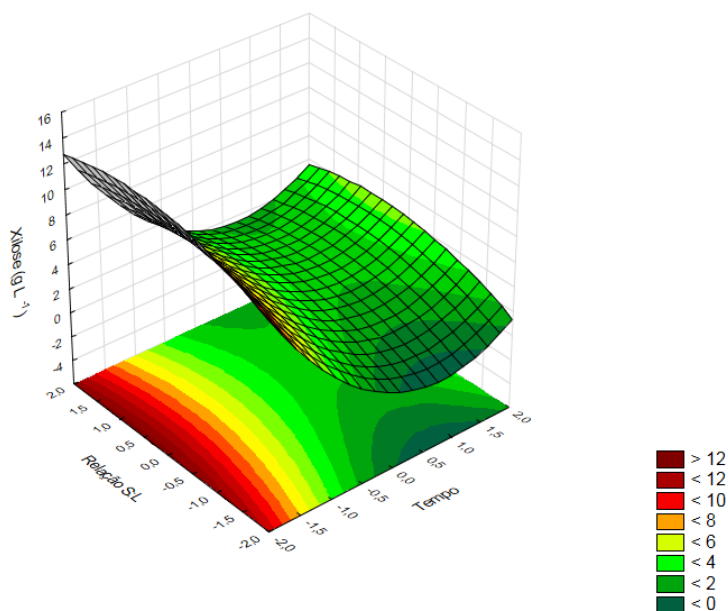


Figura 24. Superfície de resposta para concentração de xilose (g L^{-1}) em função da relação sólido:líquido e do tempo.

A formação de produtos secundários, os quais são inibidores do processo fermentativo, é a principal desvantagem da utilização de ácidos no pré-tratamento, pois diminuem o rendimento de pentoses e hexoses por degradação levando a formação de furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulinico. ^{11,27,29}

Para a verificação dos resultados que mostraram o efeito negativo do uso de ácido sulfúrico na concentração de açúcares, foi realizado um novo pré-tratamento da biomassa. Esse pré-tratamento utilizou a menor concentração de ácido sulfúrico (0,11% v v⁻¹) por menor período de tempo (5 minutos) e maior relação sólido:líquido (1:2 g mL⁻¹) a 120°C, seguido de pré-tratamento alcalino com NaOH 0,5 M, relação sólido:líquido (1:2 g mL⁻¹), por 30 minutos.

Para verificar o efeito apenas do pré-tratamento hidrotérmico, realizou-se um outro pré-tratamento, sem a utilização de ácido sulfúrico. Porém, neste caso, a biomassa foi tratada com água nas mesmas condições, por 5 minutos e relação sólido:líquido (1:2 g mL⁻¹) a 120°C, seguido de pré-tratamento alcalino com NaOH 0,5M, relação sólido:líquido (1:2 g mL⁻¹), por 30 minutos a 127°C.

O terceiro pré-tratamento foi realizado apenas com NaOH 0,5M, relação sólido:líquido (1:2 g mL⁻¹), por 30 minutos a 127°C, sem nenhum pré-tratamento prévio ao alcalino. Todos os pré-tratamentos foram realizados em triplicatas.

As biomassas resultantes dos três pré-tratamentos e a biomassa de arundo integral (sem nenhum pré-tratamento químico) foram submetidas à hidrólise enzimática nas mesmas condições já descritas. A Tabela XVIII apresenta as concentrações de glicose, xilose, HMF e furfural obtidas nestas condições.

Tabela XVIII. Concentrações de glicose, xilose, HMF e furfural nos hidrolisados obtidos da biomassa pré-tratada.

Pré-tratamento	Concentrações (g L ⁻¹)			
	Glicose	Xilose	HMF	Furfural
Ácido + Alcalino	62,0±14,8 a	19,7±3,9 a	0,01±0,01	0,01±0,00
Água + Alcalino	62,4±11,1 a	20,0±3,7 a	nd	0,01±0,00
Alcalino	53,2±6,2 a	17,3±1,6 a	0,01±0,01	0,01±0,00
Sem pré-tratamento	0,75±0,55 b	1,25±0,85 b	0,03±0,03	0,01±0,01

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%

As maiores concentrações médias de açúcares foram obtidas com os pré-tratamentos ácido seguido de alcalino e água seguida de alcalino. Porém a utilização de apenas do pré-tratamento alcalino permitiu a liberação dos açúcares glicose e xilose em concentrações que não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey com 95% de

confiança. As concentrações de HMF e furfural não diferiram significativamente entre os pré-tratamentos.

Os resultados comprovam ainda a necessidade do pré-tratamento da biomassa, visto que, quando não foi realizado nenhum pré-tratamento químico as concentrações de glicose e xilose foram extremamente baixas.

A Tabela XIX apresenta a composição química das biomassas submetidas aos diferentes pré-tratamentos químicos e da biomassa sem pré-tratamento (dados já apresentados na Tabela IX).

Tabela XIX. Composição química das biomassas após pré-tratamento de *Arundo*.

Componentes	Sem Pré-tratamento	Ácido	Ácido + Alcalino	Alcalino
Extrativos	14,68±0,5 a	3,68±0,5 b	0,53±0,2 d	1,93±0,3 c
Celulose	33,3±4,4 b	30,7±6,4 b	47,2±3,2 a	52,4±3,8 a
Hemicelulose	14,6±2,3 a	16,28±1,6 a	18,4±1,8 a	16,16±2,8 a
Lignina insolúvel	19,6±0,4 a	19,6±0,6 a	11,08±1,1 b	10,71±0,7 b
Cinzas	3,6±0,3 b	5,14±0,0 a	0,12±0,0 c	0,12±0,03 c

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%

Em todos os pré-tratamentos houve redução significativa no teor de extrativos em comparação à biomassa sem pré-tratamento. Este comportamento é esperado, visto que no processo de pré-tratamento, a biomassa é submetida ao aquecimento e posterior lavagem e nestas etapas pode ocorrer a solubilização de extrativos. Pré-tratamentos alcalinos são eficientes na remoção de lignina, observando-se que a biomassa obtida apenas com pré-tratamento ácido não apresentou alteração no teor de lignina comparada a biomassa sem pré-tratamento. Quando foi aplicado o pré-tratamento alcalino, o teor médio de lignina foi reduzido de 19,6 % para aproximadamente 11%. Os teores de hemicelulose nas biomassas submetidas aos diferentes pré-tratamentos não apresentaram diferença significativa em relação à biomassa sem pré-tratamento.

Um dos principais objetivos do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração é o aumento da acessibilidade da celulose pela remoção de lignina. As biomassas submetidas ao pré-tratamento alcalino mostraram aumento significativo nos teores de celulose variando de 33,3% para 47,2% e 52,4%,

quando submetidas aos pré-tratamentos ácido seguido de alcalino e apenas alcalino, respectivamente.

A presença de lignina na biomassa é indesejável na hidrólise enzimática, pois ligações improdutivas entre o composto polifenólico e as enzimas diminuem o rendimento de hidrólise.^{6, 84}

As alterações ocorridas nas biomassas após as etapas de pré-tratamento podem ser observadas na Figura 25. A biomassa integral está apresentada na Figura 24A, seguida da biomassa submetida ao pré-tratamento ácido (Figura 24 B) e abaixo a biomassa submetida ao pré-tratamento ácido seguido de alcalino (Figura 24 C).



Figura 25. Biomassa sem pré-tratamento (A), biomassa após tratamento ácido (B) e biomassa após tratamento ácido seguido de alcalino (C).

A utilização apenas do pré-tratamento alcalino é vantajosa para o processo porque além da redução de custo pela eliminação de uma etapa e da redução do uso de água para a lavagem da biomassa após o processo, não há a necessidade de neutralização do ácido utilizado. Além disso, a perda de massa no pré-tratamento ácido é, em média 37,61%, sendo necessário maior quantidade inicial de biomassa nas etapas prévias e hidrólise enzimática.

A Figura 26 apresenta a concentração de glicose liberada na hidrólise enzimática dos três pré-tratamentos testados.

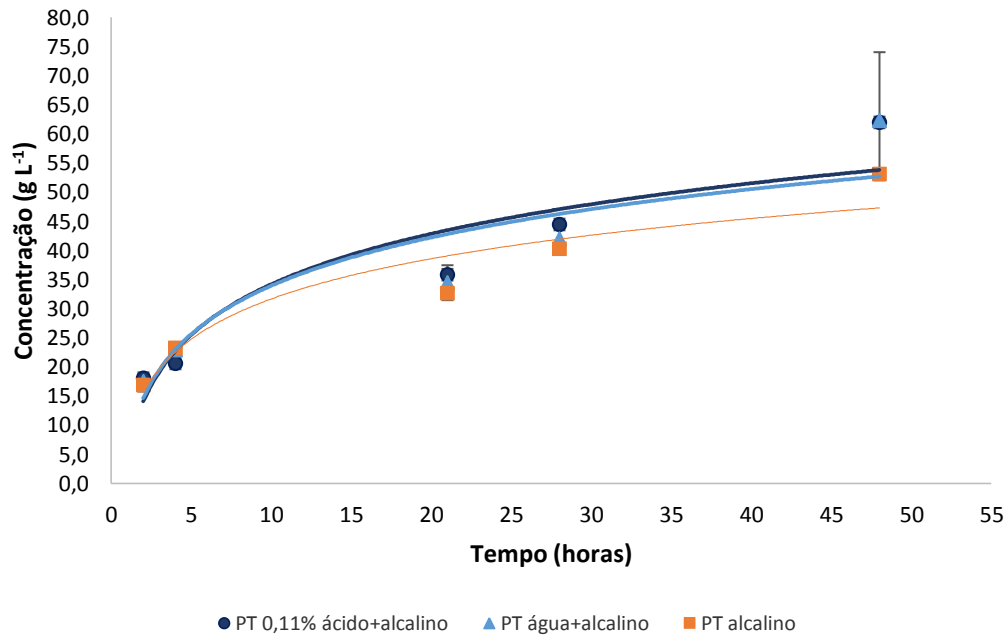


Figura 26. Concentração de glicose na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada em três diferentes condições: pré-tratamento ácido seguido de alcalino (●); pré-tratamento com água seguido de alcalino (▲) e pré-tratamento alcalino (■).

A hidrólise enzimática foi realizada por 48 horas e neste período a concentração de glicose aumentou. Após 21 horas do início da hidrólise, mais de 55% da concentração final de glicose já tinha sido liberada da biomassa pré-tratada. O conhecimento do perfil de liberação de glicose na hidrólise enzimática é importante para determinar as condições de hidrólise e fermentação.

Os hidrolisados obtidos nas três condições testadas foram fermentados (conforme metodologia descrita em 4.6.1) para verificação dos rendimentos de etanol. A concentração de etanol obtida após 18 horas de fermentação utilizando *Saccharomyces cerevisiae* comercial, assim como o rendimento por massa de biomassa estão apresentados na Tabela XX.

Tabela XX. Concentração de etanol obtida na fermentação de hidrolisados de arundo, rendimento de etanol por massa de arundo e estimativa de rendimento por área plantada.

Pré-tratamento	Ácido + Alcalino	Água + Alcalino	Alcalino
Concentração Etanol (g L ⁻¹)	12,7±0,6 b	11,2±0,6 c	14,6±0,14 a
Massa Etanol por massa arundo (kg.T ⁻¹) ^a	21,2	18,7	36,5
Volume Etanol por massa de arundo (L.T ⁻¹) ^b	26,8	23,6	46,2

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%

^a Considerando a perda de massa nas etapas de pré-tratamento

^b massa específica do etanol de 0,789 g mL⁻¹

A maior concentração de etanol foi obtida aplicando apenas o pré-tratamento alcalino, assim como o volume de etanol por massa. O volume de etanol por massa calculado utilizando o pré-tratamento alcalino foi aproximadamente o dobro dos volumes calculados para os demais pré-tratamentos (ácido sulfúrico ou água), isto é resultado da menor perda de massa no pré-tratamento alcalino quando comparado aos pré-tratamentos em duas etapas, além da maior concentração de etanol. Estes resultados justificam a eliminação da etapa de pré-tratamento ácido e a necessidade de otimização do pré-tratamento alcalino para produção de etanol.

5.2.2 Pré-tratamento alcalino

Foi realizado a avaliação das condições de pré-tratamento alcalino sem pré-tratamento ácido prévio da biomassa de arundo, sendo as variáveis analisadas a concentração de hidróxido de sódio e relação sólido:líquido. A perda de massa e as concentrações de glicose, xilose e celobiose nos hidrolisados das biomassas pré-tratadas estão apresentados na Tabela XXI.

A menor perda de massa (47,92%) foi obtida com a utilização da menor concentração de hidróxido de sódio (0,3 M), assim como a maior perda de massa (57,89%) foi obtida com a maior concentração de hidróxido de sódio (1,7 M). A perda de massa média nas condições de pré-tratamento avaliadas foi de 54,37% ± 3,54.

A concentração de glicose no pré-tratamento variou de 45,2 g L⁻¹ a 85,5 g L⁻¹. A menor concentração foi obtida com a menor concentração de hidróxido de sódio (0,3 M, 1:15 g mL⁻¹), já a maior concentração de glicose foi obtida no ponto central do planejamento experimental (1,0 M, 1:15 g mL⁻¹). A concentração média de glicose no ponto central foi de 75,7 g L⁻¹ ± 8,8.

A concentração média de celobiose após a hidrólise da biomassa pré-tratada com hidróxido de sódio foi de $1,05 \text{ g L}^{-1}$, superior à concentração média obtida após o pré-tratamento ácido seguido de alcalino, $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Em relação às variáveis avaliadas no planejamento experimental, nenhuma delas apresentou efeito significativo na concentração de celobiose, sendo o valores de $p= 0,855$ para a concentração de NaOH e $p= 0,311$ para a relação sólido:líquido e $p= 0,539$ para a interação entre as variáveis.

Tabela XXI. Valores experimentais e variáveis resposta concentração de glicose, xilose e celobiose obtidos no planejamento experimental do pré-tratamento alcalino de *Arundo donax* L.

	Conc. NaOH	Relação S:L	Perda de massa (% m m ⁻¹)	Concentrações (g L ⁻¹)		
				Glicose	Xilose	Celobiose
1	0,5	1:20	51,40	48,3	15,7	1,1
2	1,5	1:20	59,01	74,8	10,7	1,1
3	0,5	1:10	48,91	65,7	23,8	1,1
4	1,5	1:10	56,69	51,3	8,8	1,0
5	0,3	1:15	47,92	45,2	17,9	0,9
6	1,7	1:15	57,89	58,0	8,0	1,0
7	1,0	1:22	55,49	59,2	12,5	1,2
8	1,0	1:7,9	54,12	50,9	13,7	1,1
9	1,0	1:15	55,85	73,3	15,4	0,9
10	1,0	1:15	55,00	85,5	17,7	1,0
11	1,0	1:15	55,83	68,4	14,6	1,1

S = sólido; L = líquido

A concentração de xilose variou de $8,0 \text{ g L}^{-1}$ a $23,8 \text{ g L}^{-1}$, sendo a menor concentração de xilose obtida com a maior concentração de hidróxido de sódio, indicando efeito negativo da concentração de hidróxido de sódio na concentração de xilose. A concentração média de xilose no ponto central foi de $15,9 \text{ g L}^{-1} \pm 1,6$.

A Tabela XXII apresenta as estimativas dos efeitos das variáveis na concentração de glicose. Os efeitos quadráticos das duas variáveis e a interação entre as variáveis foram significativamente negativos para a concentração de glicose. Para a

construção do modelo matemático todos os termos foram mantidos no modelo, incluindo os que não foram significativos (Equação 15).

$$\text{Glicose} = 75,71 + 3,78 x_1 - 10,41 x_1^2 + 2,23 x_2 - 8,76 x_2^2 - 10,22 x_1x_2 \quad (15)$$

Tabela XXII. Estimativa dos efeitos para concentração de glicose obtidos no pré-tratamento alcalino de *Arundo donax* L.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	75,71	4,14	18,31	0,00001
(x ₁) Conc. NaOH(L)	7,56	5,07	1,49	0,1963
Conc. NaOH(Q)	-20,81	6,05	-3,44	0,0185
(x ₂)Relação sólido:líquido (L)	-4,46	5,07	0,88	0,4191
Relação sólido:líquido (Q)	-17,34	6,05	-2,86	0,03519
x ₁ x ₂	-20,45	7,16	2,86	0,0356

A Figura 27 apresenta a superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para a concentração de glicose em função das variáveis estudadas. Os pontos referentes ao ensaio 2 (1,5M, 1:20 g mL⁻¹) e ao ponto central (1,0 M, 1:15 g mL⁻¹) estão na região de maior concentração de glicose. Neste caso a utilização das condições referentes ao ponto central é mais vantajosa, já que a concentração de hidróxido de sódio e o volume de licor negro gerado no pré-tratamento são menores e os rendimentos de glicose equivalentes.

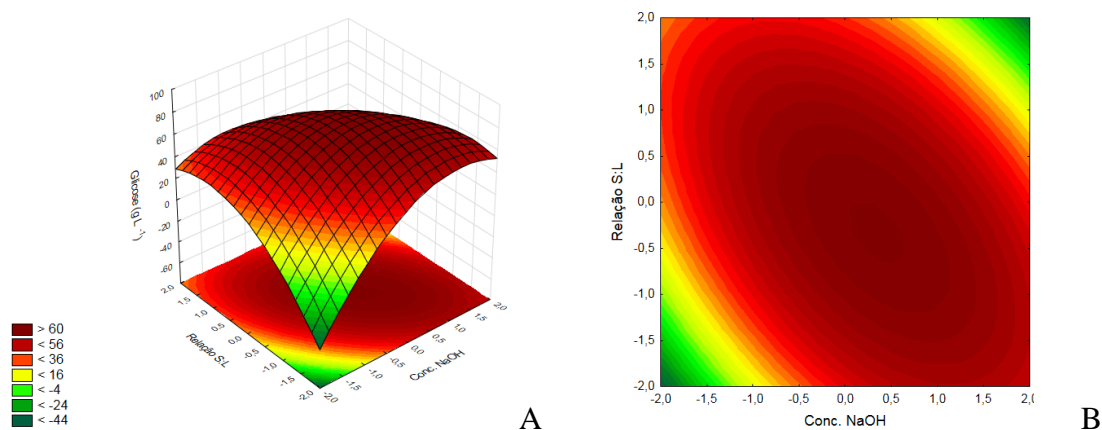


Figura 27. Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B) para concentração de glicose em função das variáveis concentração de hidróxido de sódio e relação sólido:líquido no pré-tratamento alcalino de arundo.

A Tabela XXIII apresenta a estimativa dos efeitos para a concentração de xilose obtida na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada. A concentração de hidróxido de sódio e a interação entre as variáveis estudadas apresentaram efeito negativo significativo na concentração de xilose.

Para a construção do modelo matemático todos os termos foram mantidos no modelo, incluindo os que não foram significativos (Equação 16).

$$\text{Xilose} = 15,89 + 4,25 x_1 - 1,04 x_1^2 - 0,98 x_2 - 0,97 x_2^2 - 2,50 x_1x_2 \quad (16)$$

Tabela XXIII. Estimativa dos efeitos para concentração de xilose obtidos no pré-tratamento alcalino de *Arundo donax* L.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	15,89	1,10	14,44	0,00003
(x ₁) Conc. NaOH(L)	-8,52	1,35	-6,31	0,0015
Conc. NaOH(Q)	-2,08	1,61	-1,29	0,2521
(x ₂)Relação sólido:líquido (L)	1,98	1,35	-1,47	0,2025
Relação sólido:líquido (Q)	-1,93	1,61	-1,20	0,2836
x ₁ x ₂	-5,00	1,91	2,62	0,0469

A Figura 28 apresenta a superfície de resposta da concentração de xilose em função das variáveis estudadas. É possível verificar o efeito negativo da concentração de hidróxido de sódio na concentração de xilose. A região de maior concentração de xilose (região coloração vermelha) está situada na direção de menor concentração de hidróxido de sódio.

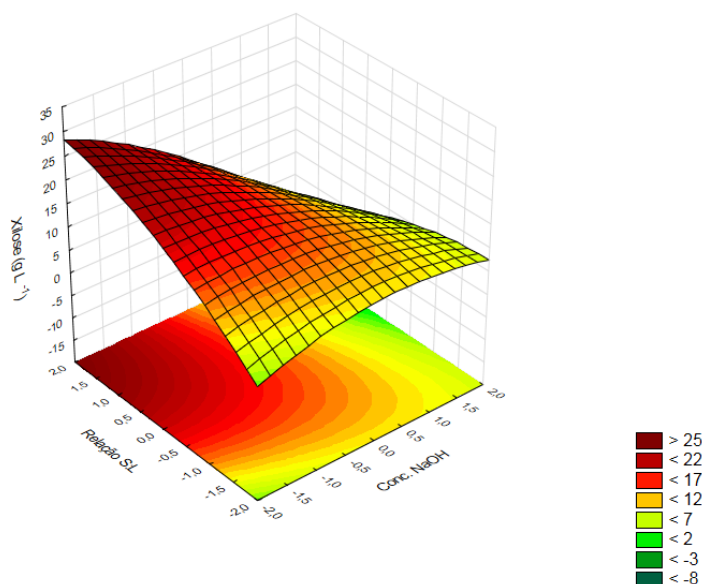


Figura 28. Superfície de resposta para concentração de xilose em função das variáveis concentração de hidróxido de sódio e relação sólido:líquido no pré-tratamento alcalino de arundo.

Os valores de p (p -value) para glicose ($p=0,00001$) e xilose ($p=0,00003$) mostram que os modelos são significativos. A Tabela XXIV apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão do pré-tratamento alcalino para as concentrações de glicose e xilose.

TabelaXXIV. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão do pré-tratamento alcalino para concentrações de glicose e xilose.

	Glicose				Xilose			
	SS	DF	MS	F-value	SS	DF	MS	F-value
Modelo	1373,2	5	274,6	5,35	186,2	5	37,2	10,25
(1) NaOH (L)	114,0	1	114,0	2,22	144,6	1	144,6	39,81
NaOH (Q)	606,6	1	606,6	11,82	6,1	1	6,1	1,68
(2) Relação S:L (L)	39,7	1	39,74	0,77	7,8	1	7,8	2,15
Relação S:L (Q)	421,2	1	421,2	8,21	5,2	1	5,2	1,44
1L by 2L	418,2	1	418,2	8,15	25,0	1	25,0	6,88
Erro	256,5	5	51,30		18,2	5	3,6	
Total	1629,7	10			204,3	10		

SS = soma dos quadrados; DF = graus de liberdade; MS= quadrado médio

Para ambos os modelos o valor de F calculado foi maior que o valor de F tabelado (5,05), confirmando que o modelo é válido no intervalo de confiança de 95%. Os coeficientes de determinação (R^2) foram 0,8426 para concentração de glicose e 0,9111 para concentração de xilose os quais indicam boa correlação entre os dados preditos e observados.

Foram determinadas também as concentrações dos inibidores ácido acético, HMF e furfural (Tabela XXV). As variáveis analisadas não apresentaram efeito na concentração de ácido acético que variou de 0,7 a 1,2 g L⁻¹, sendo os valores de p= 0,243 para a concentração de hidróxido de sódio, p=0,926 para a relação sólido:líquido e p= 0,362 para a interação entre as variáveis. Foi detectado HMF apenas em três ensaios do planejamento experimental para o pré-tratamento alcalino. A concentração de furfural foi de 0,01 g L⁻¹ em todos os ensaios e não diferiu das concentrações obtidas no pré-tratamento ácido seguido de alcalino (Tabela XV).

Tabela XXV. Valores experimentais concentração de ácido acético, HMF e furfural obtidos no planejamento experimental do pré-tratamento alcalino de *Arundo donax* L.

	Conc. NaOH	Relação S:L	Concentrações (g L ⁻¹)		
			Ácido acético	HMF	Furfural
1	0,5	1:20	1,1	0,01	0,01
2	1,5	1:20	0,9	nd	0,01
3	0,5	1:10	1,2	0,01	0,01
4	1,5	1:10	0,7	0,02	0,01
5	0,3	1:15	0,8	nd	0,01
6	1,7	1:15	0,9	nd	0,01
7	1,0	1:22	1,0	nd	0,01
8	1,0	1:7,9	0,9	nd	0,01
9	1,0	1:15	1,0	nd	0,01
10	1,0	1:15	0,9	nd	0,01
11	1,0	1:15	0,95	nd	0,01

LD = 0,000035 g L⁻¹; LQ = 0,00011 g L⁻¹

Para confirmação das condições de pré-tratamento selecionadas, foi realizado novo pré-tratamento da biomassa de arundo com hidróxido de sódio 1,0 M, relação

sólido:líquido 1:15 g mL⁻¹ a 127°C por 30 minutos, em triplicata. A biomassa pré-tratada e seca após lavagem e ajuste de pH foi submetida à hidrólise enzimática, e as concentrações de glicose, xilose, celobiose, HMF e furfural foram determinadas por HPLC.

A Figura 29 apresenta o perfil de liberação de açúcares na hidrólise da biomassa pré-tratada de arundo.

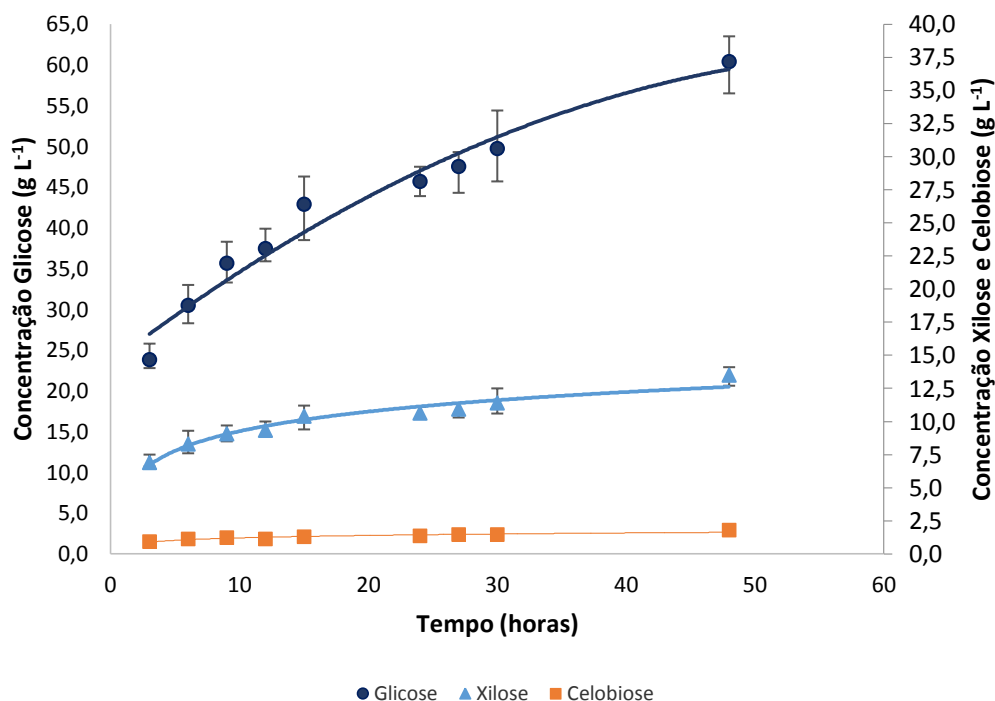


Figura 29. Concentrações de glicose (●), xilose (▲) e celobiose (■) na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada com hidróxido de sódio.

As maiores concentrações de glicose, xilose e celobiose foram obtidas após 48 horas de hidrólise. Após 6 horas de hidrólise já se obteve 50,5% da concentração final de glicose e decorridas 15 horas de hidrólise, a concentração de glicose foi de 71% da concentração máxima obtida.

A concentração de xilose aumentou de 6,9 g L⁻¹ após 2 horas para 13,5 g L⁻¹ após 48 horas e apresentou comportamento similar a concentração de glicose. Em 6 horas de hidrólise obteve-se 61,5% da concentração máxima e em 15 horas obteve-se 77% da concentração final de xilose. A concentração de celobiose variou de 0,93 g L⁻¹ a 1,80 g L⁻¹ durante o período de hidrólise.

A concentração de HMF, furfural e ácido acético foram determinadas ao final da hidrólise enzimática (Tabela XXVI).

Tabela XXVI. Concentração de HMF, furfural e ácido acético após 48 horas de hidrólise da biomassa obtida no pré-tratamento alcalino de *Arundo donax* L.

Pré-tratamento	Concentrações (g L ⁻¹)		
	Ácido acético	Furfural	HMF
Alcalino (NaOH 1,0M, 1:15 g mL ⁻¹)	0,57 ± 0,06	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00

A concentração média de ácido acético, 0,57 g L⁻¹ foi menor do que a média obtida no ponto central do planejamento experimental, 0,95 g L⁻¹. As concentrações de HMF e furfural no pré-tratamento alcalino nas condições selecionadas não diferiram das concentrações obtidas somente com o pré-tratamento ácido.

5.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A avaliação das condições de hidrólise enzimática é de grande importância para a viabilidade do processo de produção de etanol de segunda geração em função do elevado custo de enzimas. Os principais fatores que afetam a velocidade de hidrólise são a carga enzimática e a relação sólido:líquido.

Após a otimização das condições de pré-tratamento da biomassa de arundo, foi realizado planejamento experimental para avaliação das condições de hidrólise enzimática, sendo as variáveis avaliadas, a carga enzimática e a relação sólido:líquido.

As concentrações de glicose e xilose e as eficiências de hidrólise calculadas a partir dos teores de celulose e hemicelulose na biomassa pré-tratada estão apresentados na Tabela XXVII.

As maiores concentrações de glicose e xilose foram obtidas no ensaio 8 que corresponde a carga enzimática média (50 FPU g⁻¹) e a maior relação sólido:líquido (1:5,8 g mL⁻¹). Com menor carga enzimática (7,7 FPU g⁻¹, ensaio 5) obteve-se as menores concentrações de glicose e xilose.

Como neste experimento variou-se a massa de biomassa em relação ao volume da hidrólise, foi calculado a eficiência de hidrólise da celulose e a eficiência de hidrólise

da hemicelulose considerando os teores de polissacarídeos na biomassa e as concentrações de glicose e xilose, respectivamente.

Tabela XXVII. Concentrações de glicose e xilose e eficiências de hidrólise enzimática de *Arundo donax* L.

	Carga Enzimática	Relação S:L	Glicose (g L ⁻¹)	E.H. Celulose (%)	Xilose (g L ⁻¹)	E.H. Hemicelulose (%)
1	20	1:13	55,1	64,3	12,5	44,2
2	80	1:13	51,5	64,3	13,4	50,6
3	20	1:7	105,4	53,4	23,7	36,4
4	80	1:7	90,3	48,8	23,1	37,8
5	7,7	1:10	31,0	17,3	8,3	14,0
6	92,3	1:10	61,3	56,0	14,9	41,2
7	50	1:14,2	31,3	42,8	9,1	37,6
8	50	1:5,8	131,5	50,2	30,3	35,0
9	50	1:10	62,4	51,1	15,9	39,4
10	50	1:10	60,4	51,3	15,0	38,6
11	50	1:10	59,0	49,2	15,3	38,6

S = sólido; L = líquido

As maiores eficiências de hidrólise da celulose, 64,3%, foram obtidas nos ensaios 1 e 2 que correspondem a relação sólido:líquido 1:13 g mL⁻¹. A menor eficiência de hidrólise da celulose, assim como a menor eficiência de hidrólise da hemicelulose foram obtidas no ensaio com menor concentração de glicose e xilose (menor carga enzimática, ensaio 5). A maior concentração de glicose obtida, 131,5 g L⁻¹, corresponde a 50,2% de celulose hidrolisada. Neste ensaio também se obteve a maior concentração de xilose, porém a eficiência de hidrólise da hemicelulose, 35,0%, não foi a maior obtida, assim como a eficiência de hidrólise da celulose, 50,2%.

As Tabelas XXVIII e XXIX apresentam as estimativas dos efeitos para a concentração de glicose e xilose, respectivamente, na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada.

Tabela XXVIII. Estimativa dos efeitos para concentração de glicose obtidos na hidrólise enzimática de *Arundo donax* L.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	60,55	8,59	7,05	0,0009
(x ₁) Carga Enzimática(L)	6,02	10,53	0,57	0,5922
Carga Enzimática(Q)	-8,56	12,57	-0,68	0,5259
(x ₂)Relação sólido:líquido (L)	57,77	10,53	5,48	0,0028
Relação sólido:líquido (Q)	26,90	12,57	2,14	0,0853
x ₁ x ₂	-5,75	14,87	-0,38	0,7150

Tabela XXIX. Estimativa dos efeitos para concentração de xilose obtidos na hidrólise enzimática de *Arundo donax* L.

Fatores	Efeito	Erro padrão	t(5)	p-valor
Média	15,39	1,50	10,25	0,0002
(x ₁) Carga Enzimática(L)	2,41	1,84	1,31	0,2477
Carga Enzimática(Q)	-2,54	2,20	-1,16	0,2993
(x ₂)Relação sólido:líquido (L)	12,74	1,84	6,92	0,0010
Relação sólido:líquido (Q)	5,60	2,20	2,55	0,0512
x ₁ x ₂	-0,75	2,60	-0,29	0,7846

A Figura 30 apresenta a superfície de resposta da concentração de glicose e a Figura 31 apresenta a superfície de resposta para a concentração de xilose em função da carga enzimática e da relação sólido:líquido. O comportamento foi similar para glicose e xilose. A região de coloração vermelha, maior concentração de açúcares, se estende ao longo de todo o eixo da carga enzimática indicando que a variável não tem efeito significativo na variável resposta, conforme apresentado nas Tabelas XXVIII e XXIX. Observa-se também que a região de maior concentração de açúcares está situada no maior valor da relação sólido:líquido, variável que apresenta efeito significativo na resposta.

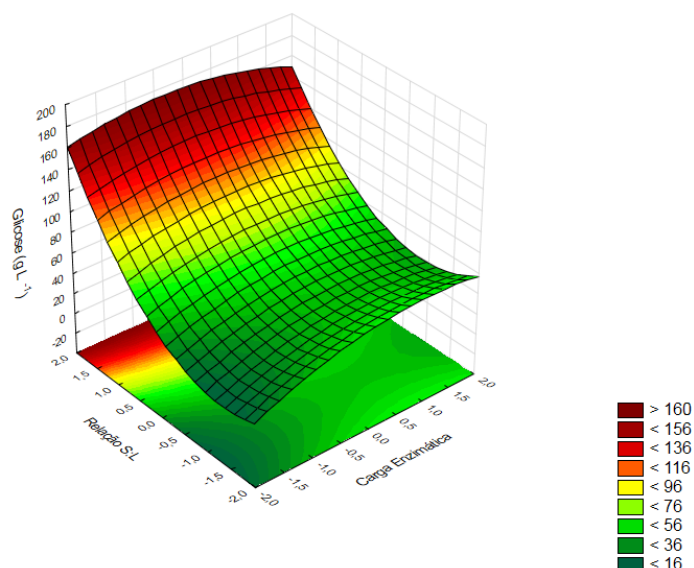


Figura 30. Superfície de resposta para concentração de glicose na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada com hidróxido de sódio.

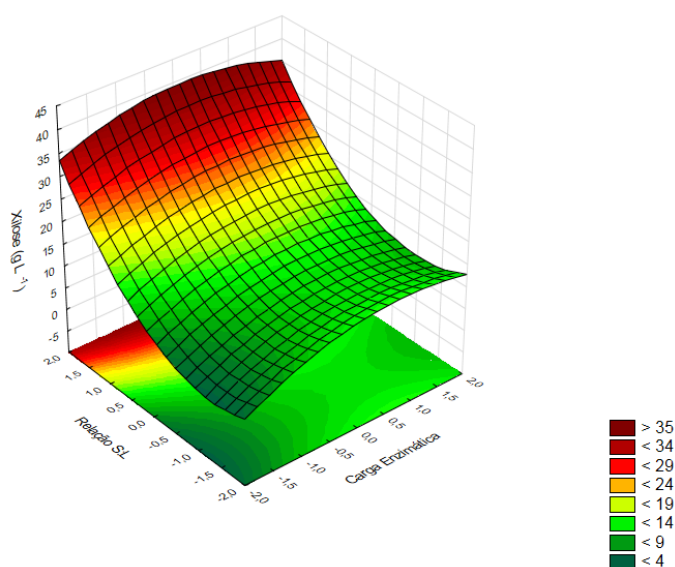


Figura 31. Superfície de resposta para concentração de xilose na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada com hidróxido de sódio.

O aumento do teor de sólidos, ou redução na relação sólido:líquido, na hidrólise enzimática é vantajoso pois produzem hidrolisados com altas concentrações de açúcares,⁹¹ conforme observado nos experimentos com menor relação sólido:líquido (maior carga de sólidos). Nestes experimentos (ensaio 3 e 8), as eficiências de hidrólise não foram as maiores obtidas e isto pode ser decorrente da inibição enzimática pelo produto final da hidrólise.

Para seleção das condições de hidrólise enzimática é necessário considerar como será conduzida a fermentação dos açúcares. A fermentação pode ser realizada em processo separado da hidrólise enzimática (SHF- fermentação e hidrólise separadas) ou simultâneas (SSF – sacarificação e fermentação simultâneas). Este último tem como principal vantagem a não inibição de celulase por glicose, pois a medida que a glicose é liberada na hidrólise enzimática é fermentada a etanol.

5.4 FERMENTAÇÃO

A partir dos resultados obtidos na avaliação das condições de hidrólise enzimática, foram testadas as condições de maior eficiência de hidrólise e maior concentração de glicose nos processos SHF (fermentação e hidrólise separadas) e SSF (sacarificação e fermentação simultâneas).

5.4.1 Processo SHF

No processo SHF a hidrólise enzimática e a fermentação são conduzidas em etapas separadas. Foram selecionadas três condições de obtenção dos hidrolisados; a primeira, referente a carga enzimática de 15 FPU g⁻¹ e relação sólido:líquido 1:10 g mL⁻¹ e mesma condição utilizada nos ensaios de pré-tratamento; a segunda condição, a que apresentou maior eficiência na conversão da celulose em glicose, obtida no primeiro ensaio de planejamento experimental para a hidrólise enzimática (20 FPU g⁻¹ e relação sólido:líquido 1:13 g mL⁻¹) e a terceira, referente ao hidrolisado com maior concentração de glicose, obtida no ensaio 8 do planejamento experimental (50 FPU g⁻¹ e relação sólido:líquido 1:5,8 g mL⁻¹).

Os hidrolisados foram submetidos à fermentação utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A Figura 32 apresenta o perfil de consumo de glicose e formação de etanol para o hidrolisado obtido com 15 FPU g⁻¹ da celulase Cellic CTec 3 e relação sólido:líquido de 1:10 g mL⁻¹, durante 20 horas de fermentação. A concentração média inicial de glicose foi de 53,75 g L⁻¹ e a concentração máxima de etanol foi de 19,4 g L⁻¹ obtida após 8 horas de fermentação, momento no qual a concentração de glicose foi de 0,4 g L⁻¹.

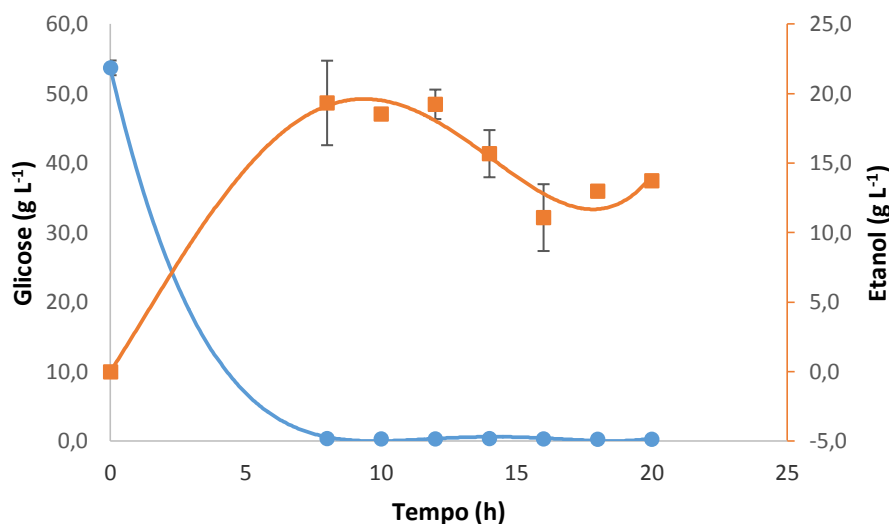


Figura 32. Perfil de consumo de glicose (●) e produção de etanol (■) na fermentação através do processo SHF de hidrolisado de biomassa de arundo obtido por hidrólise com carga enzimática de 15 FPU g⁻¹ e relação sólido:líquido 1:10 g mL⁻¹.

A fermentação do hidrolisado obtido com carga enzimática de 20 FPU g⁻¹ e relação sólido:líquido 1:13 g mL⁻¹, que corresponde ao primeiro ensaio da planejamento experimental para avaliação das condições de hidrólise enzimática, no qual obteve-se maior conversão de celulose em glicose está apresentada na Figura 33.

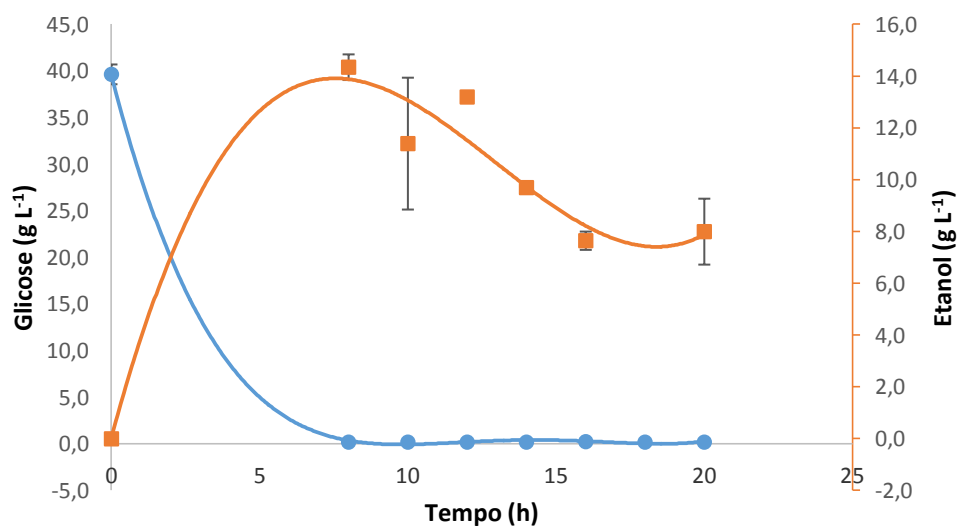


Figura 33. Perfil de consumo de glicose (●) e produção de etanol (■) na fermentação através do processo SHF de hidrolisado de biomassa de arundo obtido por hidrólise com carga enzimática de 20 FPU g⁻¹ e relação sólido:líquido 1:13 g mL⁻¹.

A concentração inicial média de glicose foi de $39,6 \text{ g L}^{-1}$ e, após 8 horas de fermentação, a concentração de etanol foi $14,5 \text{ g L}^{-1}$, a partir deste momento a concentração de glicose foi de $0,2 \text{ g L}^{-1}$.

A terceira condição testada foi referente ao hidrolisado com maior concentração de glicose, obtido no ensaio 8 do planejamento para a hidrólise enzimática. A concentração de glicose inicial foi de $94,75 \text{ g L}^{-1}$ e a concentração máxima de etanol de $19,1 \text{ g L}^{-1}$ em 20 horas de fermentação (Figura 34). Ao final do período de fermentação a concentração média de glicose não consumida foi alta, $37,6 \text{ g L}^{-1}$. Este resultado possivelmente foi devido ao tempo de fermentação insuficiente e as dosagens de levedura e de nutrientes do meio de fermentação que foram os mesmos adicionados aos demais experimentos em que a concentração inicial de glicose foi menor.

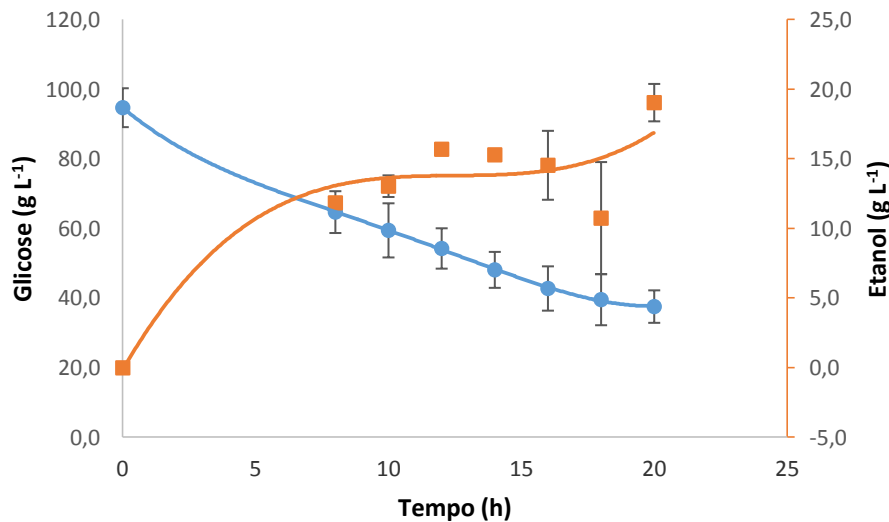


Figura 34. Perfil de consumo de glicose (●) e produção de etanol (■) na fermentação através do processo SHF de hidrolisado de biomassa de arundo obtido por hidrólise com carga enzimática de 50 FPU g^{-1} e relação sólido:líquido $1:5,8 \text{ g mL}^{-1}$.

O tempo de fermentação é um dos fatores que tem influência na eficiência de conversão de açúcares em etanol e no crescimento das leveduras. Fermentação insuficiente pode ocorrer quando curtos períodos de tempo são empregados e longos períodos de fermentação podem causar efeitos tóxicos ao crescimento de microrganismos pela alta concentração de etanol e pela formação de produtos secundários.³⁶

Neste trabalho, o tempo máximo avaliado na fermentação dos hidrolisados de arundo foi de 20 horas, que é superior ao tempo de fermentação industrial de caldo de cana-de-açúcar, principal matéria-prima para produção de etanol no Brasil, que varia de 6 a 12 horas.¹⁵

A Tabela XXX apresenta os resultados obtidos na fermentação dos três hidrolisados de biomassa de arundo e os fatores de rendimento de produção de etanol ($Y_{P/S}$), eficiência de fermentação (E.F %), produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e redução percentual de substrato (RPS %) calculados para os três experimentos de hidrólise separada da fermentação.

Tabela XXX. Concentração de glicose e etanol ($g L^{-1}$) e rendimentos obtidos na fermentação de hidrolisados de *Arundo donax* L.

	15 FPU g^{-1} 1:10 $g mL^{-1}$	20 FPU g^{-1} 1:13 $g mL^{-1}$	50 FPU g^{-1} 1:5,8 $g mL^{-1}$
Concentração inicial de glicose ($g L^{-1}$)	53,75±1,1	39,65±1,1	94,75±5,6
Concentração final de glicose ($g L^{-1}$)	0,4±0,0	0,2±0,0	37,6±4,7
Concentração máxima de etanol ($g L^{-1}$)	19,4±3,0	14,5±0,5	19,1±1,3
Tempo de fermentação (h)	8	8	20
$Y_{P/S}$	0,363	0,364	0,333
Redução percentual de substrato (%)	99,2	99,5	60,3
Eficiência de fermentação (%)	71,0	71,2	65,2
Q_P ($g L^{-1} h^{-1}$)	2,419	1,794	0,953
Massa Etanol por massa arundo ($kg T^{-1}$) ^a	49,0	43,9	21,1
Volume Etanol por massa arundo ($L T^{-1}$)	62,0	55,7	26,7

$Y_{P/S}$: fator de rendimento de produção de etanol

Q_P : produtividade volumétrica em etanol

^a Considerando a perda de massa no pré-tratamento

Os experimentos partiram de diferentes concentrações de glicose e as concentrações de etanol obtidas nos ensaios 1 e 3 foram equivalentes. A concentração de etanol obtida no ensaio 2 foi menor assim como a concentração inicial de glicose.

Os maiores fatores de rendimento de etanol ($Y_{P/S}$) calculados a partir das concentrações inicial e final de glicose e etanol foram obtidos nos dois primeiros ensaios, 0,363 e 0,364, respectivamente. No terceiro ensaio o fator de rendimento de

etanol foi menor, 0,333, em função da alta concentração final de glicose no meio reacional. Este comportamento também é observado na redução percentual de substrato (RPS %), nos quais os dois primeiros experimentos obtiveram mais de 99% de redução percentual de glicose enquanto no terceiro experimento a redução foi de apenas 60,3%.

A eficiência de fermentação (E.F %), calculada a partir do $Y_{P/S}$ e o fator de conversão máximo teórico de glicose em etanol (0,511), conseqüentemente, também foi maior nos dois primeiros experimentos. A produtividade volumétrica em etanol, calculada para o tempo de fermentação no qual a concentração máxima de etanol foi obtida, foi maior para o primeiro ensaio, 2,419 g L⁻¹ h⁻¹. No segundo ensaio, onde a máxima concentração de etanol foi obtida também em 8 horas de fermentação, a produtividade volumétrica foi menor do que no primeiro em função da concentração de etanol também ter sido menor. No terceiro ensaio, obteve-se a menor produtividade volumétrica, 0,953 g L⁻¹ h⁻¹ em função do maior tempo de fermentação para obtenção da concentração máxima de etanol.

Os rendimentos de etanol em relação à massa de arundo integral também foram calculados (Tabela XXX). Considerando a perda de massa média, 55,6%, a massa de etanol obtida a cada tonelada de biomassa seca de arundo no primeiro experimento foi de 49,0 kg T⁻¹, maior do que nos demais experimentos. No terceiro experimento a massa de etanol, 21,1 kg T⁻¹, corresponde a menos do que a metade da massa obtida do primeiro experimento. O maior volume de etanol foi de 62,0 L T⁻¹, alcançado a partir da primeira condição testada.

Utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com vapor seguido de deslignificação com NaOH 0,25M, dos Santos et al. (2010)⁹² obtiveram concentração menor que 14 g L⁻¹ de etanol na fermentação (SHF) de hidrolisados com *Saccharomyces cerevisiae* e produtividade volumétrica de 0,25 g L⁻¹ h⁻¹. Rana et al. (2014)⁵⁷ obtiveram concentração máxima de etanol de 26,8 g L⁻¹ a partir de resíduos de milho e 23,3 g L⁻¹ a partir de biomassa de pinheiro pré-tratados por explosão úmida em processo SHF, os fatores de rendimento de etanol foram 0,653 e 0,583 e produtividade volumétrica 0,28 g L⁻¹ h⁻¹ e 0,24 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Utilizando biomassa (*Prosopis juliflora*) pré-tratada com ácido sulfúrico diluído, Gupta et al. (2009)⁹³ obtiveram rendimento máximo de etanol de 18,5 g L⁻¹, rendimento de etanol de 0,49 e produtividade volumétrica de 1,16 g L⁻¹ h⁻¹ após 16 horas de fermentação.

A partir de biomassa de arundo pré-tratada por explosão a vapor, Ask et al. (2012)⁹⁴ obtiveram concentração máxima de etanol de 20,6 g L⁻¹ em processo de

hidrólise e fermentação separados, utilizando cepa de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de consumir xilose.

Loaces et al. (2017)⁷⁷ obtiveram 24 g L⁻¹ de etanol a partir de biomassa de arundo pré-tratada com ácido sulfúrico diluído (2% m v⁻¹) utilizando *E. coli* como microrganismo para fermentação. A Tabela XXXI resume os resultados dos autores citados acima e compara com os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela XXXI. Concentração e produtividade volumétrica de etanol obtidos de diferentes biomassas por diferentes autores e biomassa de arundo no presente trabalho.

Biomassa	Concentração e produtividade volumétrica	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	< 14 g L ⁻¹ ; 0,25 g L ⁻¹ h ⁻¹	92
Resíduo milho; biomassa pinheiro	26,8 e 23,3 g L ⁻¹ ; 0,28e 0,24 g L ⁻¹ h ⁻¹	57
<i>Prosopis juliflora</i>	18,5 g L ⁻¹ ; 1,16 g L ⁻¹ h ⁻¹	93
Arundo	24 g L ⁻¹ ; 0,13 g L ⁻¹ h ⁻¹	77
Arundo	19,4 g L ⁻¹ ; 2,42 g L ⁻¹ h ⁻¹	Presente trabalho

A concentração máxima de etanol obtida neste trabalho pelo processo SHF foi superior às obtidas por outros autores utilizando biomassas de bagaço de cana-de-açúcar e *Prosopis juliflora*. Em outros trabalhos com o uso de resíduos de milho, biomassa de pinheiro e arundo, maiores concentrações de etanol foram obtidas, porém as produtividades volumétricas foram significativamente menores em relação ao presente trabalho. Isto deve-se ao fato de que maiores tempos de fermentações foram empregados nas fermentações relatadas na literatura. Cabe salientar ainda que Ask et al. (2012)⁹⁴ e Loaces et al. (2017)⁷⁷ obtiveram maior concentração de etanol pela fermentação de hexoses e pentoses e no presente trabalho, com o uso de *Saccharomyces cerevisiae*, apenas glicose foi fermentada.

5.4.2 Processo SSF

Foram testadas três condições para o processo SSF, com diferentes cargas de sólidos e carga enzimática. Os três experimentos testados foram conduzidos com etapa de pré-hidrólise para disponibilização de glicose e após 18 h, a levedura foi adicionada para o início da fermentação. Os sistemas reacionais foram alimentados com a metade

da massa inicial de biomassa duas vezes, após 22 e 46 horas do início do processo, sendo a massa total utilizada na fermentação o dobro da massa inicial.

A primeira condição, referente a condição que apresentou maior eficiência na conversão de celulose em glicose no planejamento experimental para a hidrólise enzimática, foi realizada com massa inicial de 20 g de biomassa pré-tratada e carga enzimática de 20 FPU g⁻¹ na pré-hidrólise (correspondente a relação sólido:líquido de 1:13 g mL⁻¹ na pré-hidrólise) e carga de sólidos total, após duas adições de 10 g de biomassa ao meio reacional, de 160 g L⁻¹. A concentração de glicose em 18 h foi de 38,7 g L⁻¹ e a concentração máxima de etanol, 28,0 g L⁻¹, obtida ao final do processo, em 78 horas de fermentação. Durante o período de fermentação, a partir de 70 horas, a concentração de glicose teve pequeno aumento de 1,0 g L⁻¹ a 5,2 g L⁻¹ ao final do processo (Figura 35).

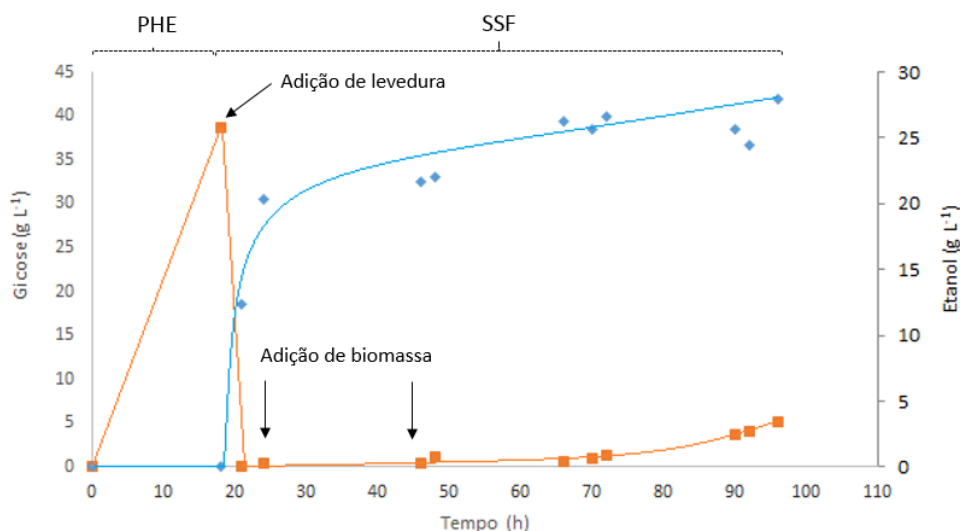


Figura 35. Perfil de consumo de glicose(■) e produção de etanol (◆) na fermentação através do processo SSF de biomassa de arundo com carga enzimática de 20 FPU g⁻¹ na pré-hidrólise e carga de sólidos de 160 g L⁻¹.

A segunda condição testada teve início com 25 g de biomassa pré-tratada e carga enzimática 25 FPU g⁻¹ em relação a massa inicial de biomassa. Na Figura 36 pode-se observar que a concentração de glicose no meio reacional foi de 52,2 g L⁻¹ em 18 horas, momento em que a levedura foi adicionada e a fermentação iniciada. O consumo de glicose foi observado já nas primeiras horas de fermentação, em 21 horas (3 horas de fermentação) a concentração de glicose foi reduzida para 0,5 g L⁻¹ e a concentração de etanol atingiu 20,7 g L⁻¹. O tempo total do processo SSF foi de 96 h (78 horas de

fermentação), porém a concentração máxima de etanol, $38,8 \text{ g L}^{-1}$, foi obtida em 74 horas de fermentação. Em 52 horas de fermentação a concentração de etanol foi de $38,1 \text{ g L}^{-1}$ e a variação em relação a máxima concentração obtida foi muito pequena. Este comportamento acarreta a redução de 22 horas de fermentação que possibilita a redução de custos no processo.

Neste experimento, a concentração inicial de glicose foi superior à do primeiro experimento e, conseqüentemente, a concentração de etanol também foi maior, porém a quantidade de biomassa utilizada também foi maior (200 g L^{-1}).

Ao final do processo, observa-se também, um pequeno aumento na concentração de glicose, de $1,9 \text{ g L}^{-1}$ em 70 horas para $7,6 \text{ g L}^{-1}$ em 96 horas.

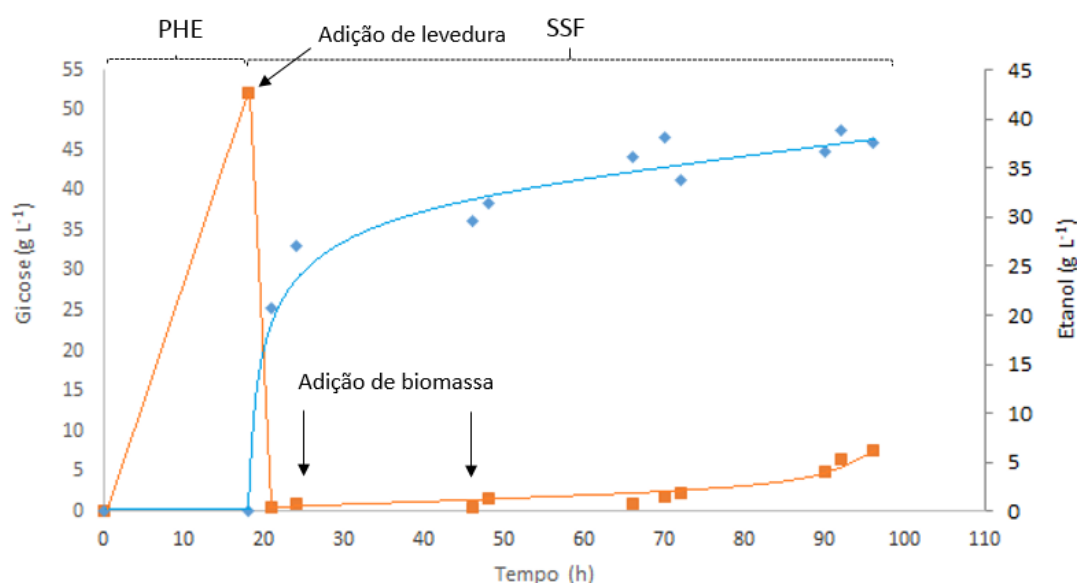


Figura 36. Perfil de consumo de glicose (■) e produção de etanol (◆) na fermentação através do processo SSF de biomassa de arundo com carga enzimática de 25 FPU g^{-1} na pré-hidrólise e carga de sólidos de 200 g L^{-1} .

O terceiro experimento foi conduzido com a pré-hidrólise nas condições de maior concentração de glicose segundo o planejamento experimental para a hidrólise enzimática, com maior carga enzimática na pré-hidrólise (50 FPU g^{-1}) e maior carga de sólidos (320 g L^{-1}). A concentração de glicose no momento da adição da levedura foi de $89,3 \text{ g L}^{-1}$ e a concentração máxima de etanol, $53,9 \text{ g L}^{-1}$ foi atingida com 48 horas de fermentação (Figura 37). A partir das 30 horas de fermentação (48 horas do início do processo) observa-se redução na taxa de fermentação pelo aumento na concentração de

glicose no meio, sendo que a concentração de etanol pode ser considerada constante neste período. Neste período a concentração de glicose teve aumento de 12,9 para 33,9 g L⁻¹ no final do processo.

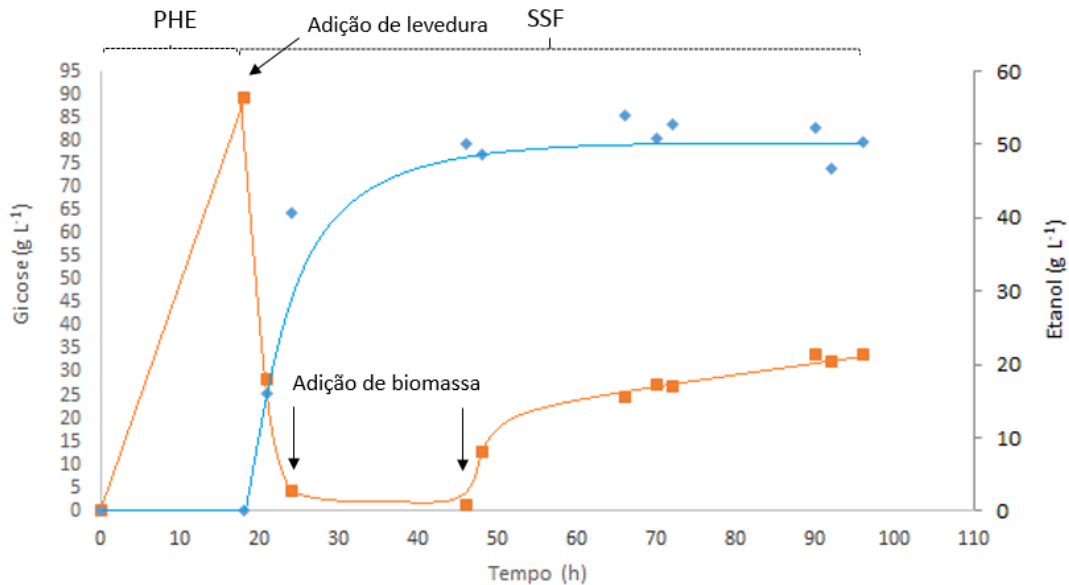


Figura 37. Perfil de consumo de glicose(■) e produção de etanol (◆) na fermentação através do processo SSF de biomassa de arundo com carga enzimática de 50 FPU g⁻¹ na pré-hidrólise e carga de sólidos de 320 g L⁻¹.

A Tabela XXXII apresenta os resultados obtidos nos três experimentos sacarificação e fermentação simultâneas.

No experimento 1 obteve-se a menor concentração de etanol e produtividade volumétrica utilizando a menor carga de sólidos (160 g L⁻¹). Com o aumento da carga de sólidos e aumento da carga enzimática na pré-hidrólise (experimento 2) houve aumento na concentração de etanol e na produtividade volumétrica, sendo que a concentração máxima de etanol foi obtida em 74 horas de fermentação, 4 horas menos que no primeiro experimento. Os rendimentos calculados em massa e o volume de etanol por massa de arundo integral, 84,7 kg T⁻¹ e 107,4 L T⁻¹ foram superiores aos demais.

No experimento 3 obteve-se maior concentração de etanol em tempo mais curto em relação aos outros dois experimentos, e conseqüentemente a produtividade volumétrica, 1,123 g L⁻¹ h⁻¹, também foi maior que os demais. Contudo, como a carga de sólidos foi maior no terceiro experimento, 320 g L⁻¹, correspondendo ao dobro do

primeiro experimento (160 g L⁻¹), os rendimentos em massa e volume de etanol por massa de arundo integral não foram superiores aos demais.

Tabela XXXII. Concentração de glicose e etanol (g L⁻¹) e rendimentos de etanol obtidos na fermentação da biomassa de *Arundo donax* L.

	SSF1	SSF2	SSF3
Carga enzimática pré-hidrólise (FPU g ⁻¹)	20	25	50
Carga de sólidos (g L ⁻¹)	160	200	320
Concentração residual de glicose (g L ⁻¹)*	5,2	6,5	24,6
Concentração máxima de etanol (g L ⁻¹)	28,0	38,8	53,9
Tempo de fermentação (h)	78	74	48
Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,359	0,524	1,123
Q _P (6h) (g L ⁻¹ h ⁻¹)	3,383	4,517	6,767
Eficiência de conversão celulose à etanol (%)	54,5	61,6	56,8
Massa de Etanol por massa arundo (kg T ⁻¹) ^a	77,8	84,7	74,9
Volume de Etanol por massa arundo (L T ⁻¹)	98,6	107,4	94,9

*Concentração de glicose no momento de maior concentração de etanol

Q_P: produtividade volumétrica em etanol

^a Considerando a perda de massa no pré-tratamento

Na Tabela XXXII estão apresentadas além das produtividades volumétricas em relação ao período de tempo correspondente a maior concentração de etanol em cada experimento, a produtividade volumétrica em 6 horas de fermentação. Esse parâmetro é importante para a avaliação, pois nas primeiras 6-8 horas a glicose é rapidamente convertida em etanol. Os valores obtidos de produtividade volumétrica, 4,517 g L⁻¹ h⁻¹ e 6,767 g L⁻¹ h⁻¹ para o segundo e terceiro experimento, respectivamente, são próximos aos obtidos em processos industriais para a conversão do caldo de cana-de-açúcar para produção de etanol, 5-8 g L⁻¹ h⁻¹.⁸⁴

Nos três experimentos testados a eficiência de conversão de celulose em etanol (ECC %) foram superiores a 54%, sendo que a maior ECC, 61,6%, foi obtida no experimento SSF 2, correspondente a carga de sólidos de 200 g L⁻¹ (Tabela XXXII).

A condição intermediária (SSF 2) aos ensaios selecionados a partir da hidrólise enzimática (SSF 1: 20 FPU g⁻¹, 1:13 g mL⁻¹ e SSF 3: 50 FPU g⁻¹, 1:5,8 g mL⁻¹)

apresentou maior eficiência de conversão de celulose à etanol e os maiores rendimentos em relação a massa de arundo utilizada no processo.

A concentração de substrato é um parâmetro que deve ser bem ajustado para o alcance de maiores rendimentos de etanol, pois tem influência nas taxas de hidrólise e fermentação e no crescimento de leveduras. Quantidades excessivas de substrato podem diminuir o rendimento de hidrólise pela limitação de transferência de massa e pela inibição das enzimas. Processos conduzidos em batelada alimentada, com a adição de biomassa em diferentes períodos de tempo, são capazes de diminuir estes efeitos e alcançar altos rendimentos de etanol.^{84, 95}

Na fermentação, o aumento na concentração de açúcares aumenta a taxa de fermentação, porém concentração de açúcares acima da capacidade de absorção das células microbianas resultam em taxa de fermentação constante.^{84, 95}

Em processos industriais altas concentrações de açúcares são usualmente vantajosas, pois geram grandes volumes de etanol e diminuem custos, porém maiores tempos de fermentação são requeridos, o que pode acarretar estresse osmótico às leveduras.^{84, 95}

As concentrações de etanol obtidas neste trabalho são superiores às obtidas por Scordia et al. (2011)¹³ que obtiveram concentração máxima de etanol de 15,9 g L⁻¹ utilizando biomassa de arundo pré-tratada com ácido oxálico diluído na sacarificação e fermentação simultâneas utilizando *Schefferomyces (Pichia) stipitis* CBS6054 e *Saccharomyces carlsbergensis*. Em outro trabalho, os mesmos autores obtiveram 18 g L⁻¹, correspondente a 75% de rendimento teórico de etanol.³⁸

Ask et al. (2012)⁹⁴ utilizaram biomassa de arundo pré-tratada por explosão a vapor como substrato para o processo SSF e a máxima concentração de etanol obtida foi de 18,9 g L⁻¹. O microrganismo utilizado na fermentação foi a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* VTT C-10880, capaz de consumir glicose e xilose.

Utilizando também o processo SSF com carga de sólidos de 250 g L⁻¹ e carga enzimática de 25 FPU g⁻¹, Lemons e Silva et al. (2014)¹¹ obtiveram 39 g L⁻¹ de etanol a partir de biomassa de arundo pré-tratada com hidróxido de sódio 0,5 M por 30 minutos a 120°C após o pré-tratamento com ácido sulfúrico 1,1% v/v, 120°C por 30 minutos. A concentração máxima obtida por Loaces et al. (2017)⁷⁷ utilizando biomassa de arundo pré-tratada com ácido sulfúrico foi de 25 g L⁻¹ na sacarificação e fermentação simultâneas.

Com bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento com ácido sulfúrico seguido de pré-tratamento com hidróxido de sódio, Maeda et al. (2013)⁸⁴ alcançarem concentração de etanol de 100 g L⁻¹, o que corresponde a 110 L de etanol por tonelada de bagaço, utilizando celulase produzida a partir de *Penicillium funiculosum* fermentação com cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* JP1.

A Tabela XXXIII apresenta os resultados dos autores citados acima e os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela XXXIII. Concentração (g L⁻¹), produtividade volumétrica (Q_P) e rendimento de etanol por massa de biomassa (L T⁻¹) obtidos de diferentes biomassas por diferentes autores e biomassa de arundo no presente trabalho.

Biomassa	Concentração (g L ⁻¹)	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Rendimento (L T ⁻¹)	Referência
Bagaço de cana	100	-	110	83
Arundo	18,9	-	-	93
Arundo	39	0,56	75	11
Arundo	25	0,26	-	76
Arundo	28-58,9	0,35-1,12	94,9-107,4	Atual

- dados não apresentados pelos autores

Neste trabalho a concentração de etanol e a produtividade volumétrica obtidas no experimento SSF3 foram superiores às relatadas a partir da biomassa de arundo pelos autores acima citados. Com o uso de bagaço de cana-de-açúcar, principal biomassa para a produção de etanol de segunda geração no Brasil, Maeda et al. (2013)⁸⁴ obtiveram concentração de etanol superior à obtida no presente trabalho. Apesar da considerável diferença na concentração de etanol a partir de bagaço de cana em relação à biomassa de arundo, o rendimento de etanol em litros por tonelada de biomassa relatados pelos autores (110 LT⁻¹) foi próximo ao obtido neste trabalho (107,4 LT⁻¹).

Os resultados obtidos no presente trabalho comprovam o potencial da biomassa de arundo para a produção de etanol de segunda geração.

5.4.3 Comparação entre SHF e SSF e considerações

Para a produção de etanol de segunda geração diferentes estratégias no processo podem ser adotadas. No presente trabalho foram avaliadas a fermentação dos açúcares

obtidos no processo de hidrólise (SHF – hidrólise separada da fermentação) e a sacarificação e fermentação simultâneas da biomassa pré-tratada, SSF, em batelada alimentada.

Diferenças nas condições de hidrólise e de fermentação afetam os rendimentos de produto final. Processos SSF tem como vantagem maior rendimento de etanol produzido pela conversão simultânea de açúcares que inibem as celulases. Porém, na literatura também são relatados trabalhos onde maiores rendimentos de etanol foram obtidos por processos SHF.⁹⁴

As concentrações de etanol obtidas neste trabalho pelo processo SSF foram superiores aos obtidos pelo processo SHF, bem como os rendimentos em massa e volume de etanol por massa de arundo. O volume de etanol produzido a cada tonelada de biomassa nos processos SHF variaram de 26,7 a 62 L, sendo o rendimento médio de 48,1 L T⁻¹. Já nos processos SSF foram alcançados rendimentos que variaram de 94,9 a 107,4 L T⁻¹, com volume médio de 100,3 L T⁻¹. O volume médio de etanol por tonelada de biomassa obtido no processo SSF é maior que o dobro do volume médio obtido no processo SHF. Os resultados indicam que, nas condições testadas, o processo SSF é mais viável para a produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa de arundo.

Neste trabalho, apenas a fração celulósica foi utilizada para a produção de etanol, porém o uso da fração hemicelulósica pode ser vantajoso para o processo pelo aumento do volume final de etanol. Para o aproveitamento dos açúcares provenientes da hemicelulose é necessário o uso de microrganismos capazes de fermentar açúcares de cinco carbonos. A concentração média de xilose, principal açúcar obtido da hemicelulose, presente nos meios de fermentação SHF estão apresentados na Figura 38.

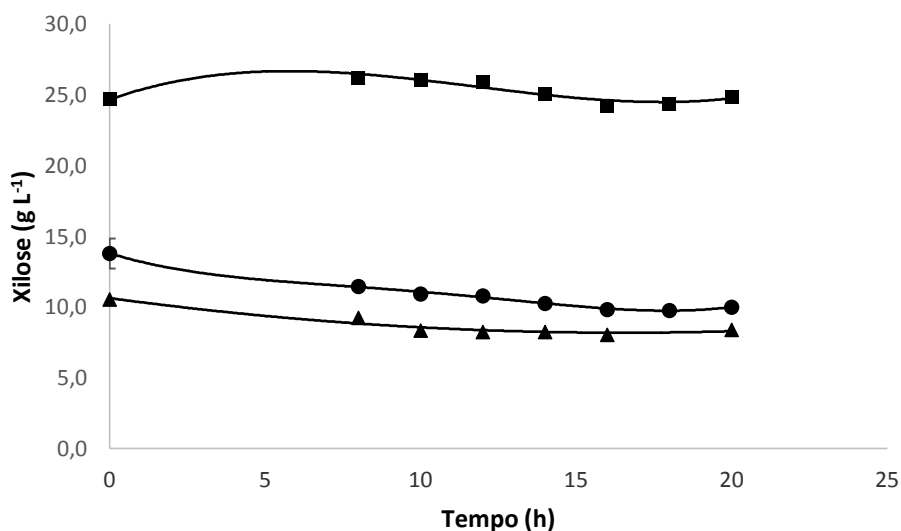


Figura 38. Concentração média de xilose durante o processo de fermentação dos hidrolisados de biomassa de arundo pré-tratada. SHF 1 (●), SHF 2 (▲) e SHF 3 (■).

A concentração média de xilose obtida no experimento SHF 3 foi superior às obtidas nos demais experimentos. Porém quando se consideram as diferentes massas utilizadas em cada experimento e a perda de massa média no pré-tratamento, os rendimentos médios de xilose por massa de arundo foram 27,5; 26,6 e 27,8 kg T⁻¹, respectivamente, os quais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Estes resultados indicam que não houve diferença no rendimento de xilose em relação a carga enzimática utilizada nos três experimentos, confirmando os resultados obtidos no planejamento experimental para a hidrólise enzimática onde a carga enzimática não apresentou efeito significativo na concentração de xilose.

A Figura 39 apresenta a concentração de xilose obtida nos experimentos de SSF, onde a maior concentração de xilose foi obtida no experimento SSF 3 com maior carga de sólidos (320 g L⁻¹). Os rendimentos de xilose por massa de arundo foram 22,5; 26,1 e 33,7 kg T⁻¹, respectivamente, calculados a partir da concentração de xilose no meio reacional e a perda de massa média no pré-tratamento. Diferentemente dos rendimentos obtidos no processo SHF onde não houve diferença significativa entre os experimentos, o rendimento de xilose obtido no processo SSF 3 foi superior aos demais experimentos em SSF.

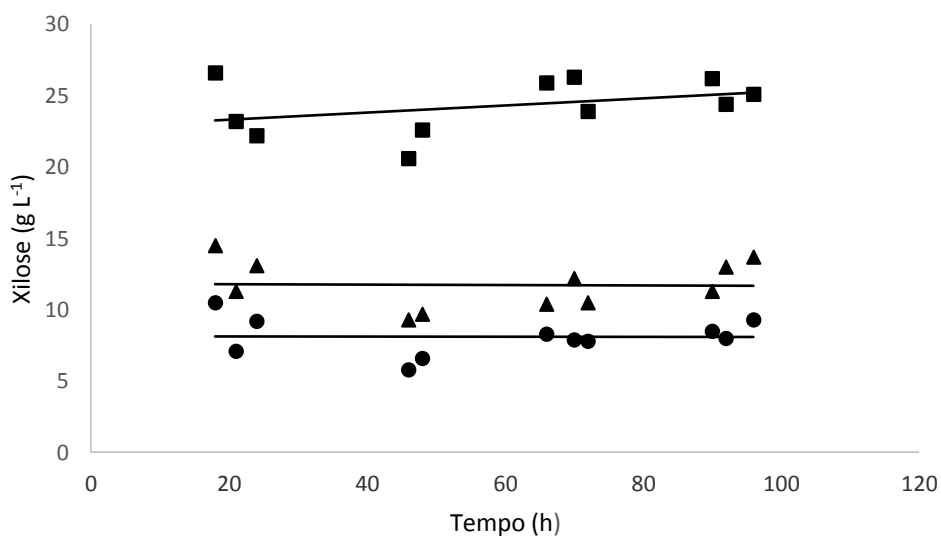


Figura 39. Concentração de xilose durante o processo de fermentação da biomassa de arundo pré-tratada. SSF 1 (●), SSF 2 (▲) e SSF 3 (■).

O rendimento teórico de etanol a partir da xilose é de $0,51 \text{ g g}^{-1}$, porém diferentes autores apresentam rendimentos que variam de $0,25$ a $0,44 \text{ g g}^{-1}$.^{13,94} Considerando apenas a concentração de xilose disponível no meio de fermentação no processo SSF e o rendimento de conversão de xilose em etanol de $0,35 \text{ g g}^{-1}$ é possível estimar aumento na concentração final de etanol de $7,9$ a $11,8 \text{ kg}$ por tonelada de biomassa de arundo.

Estudos de diferentes autores em relação a viabilidade econômica da produção de etanol de segunda geração demonstram a necessidade do uso de pentoses para a obtenção de altos rendimentos de etanol.^{62, 63} Neste sentido, a adoção de processo de co-fermentação e sacarificação simultâneas (SSCF) ou o bioprocessamento consolidado (CBP) para a fermentação de biomassas ricas em hemicelulose são considerados vantajosos.^{62,}

63

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Processo de 2º geração para à produção de etanol, utilizando a biomassa de *Arundo donax* L., desenvolvido no presente trabalho, teve como objetivo estabelecer as melhores condições de pré-tratamento, hidrólise e fermentação. Dos experimentos desenvolvidos, e dados obtidos pode-se inferir as conclusões que se seguem.

A concentração de ácido sulfúrico e o tempo de pré-tratamento apresentaram efeito positivo significativo nas concentrações de glicose e xilose nos pré-hidrolisados de arundo.

As concentrações de açúcares liberados na hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada com ácido sulfúrico nas condições estudadas foram baixas. Porém, a adição da etapa de pré-tratamento alcalino após o pré-tratamento ácido, elevou a concentração média de açúcares em 3,5 vezes e neste caso, a concentração de ácido sulfúrico apresentou efeito negativo nas variáveis respostas.

A concentração de açúcares nos hidrolisados obtidos com a biomassa pré-tratada apenas com hidróxido de sódio não diferiu estatisticamente da biomassa pré-tratada em duas etapas. Somado a esse comportamento, as concentrações de 5-hidroximetilfurfural e furfural não apresentaram diferença entre os pré-tratamentos nas condições estudadas. A eliminação de uma etapa no processo na produção de etanol é um resultado positivo, uma vez que há redução nos custos do processo, bem como menor resíduo formado.

Quando foram comparados os hidrolisados obtidos dos diferentes pré-tratamentos testados, a maior concentração de etanol foi obtida com o hidrolisado da biomassa resultante do pré-tratamento alcalino, assim como as estimativas de volume de etanol por massa e por área plantada.

Entre as variáveis estudadas, apenas a relação sólido:líquido apresentou efeito significativo nas concentrações de glicose e xilose na hidrólise enzimática. Nos experimentos de fermentação de hidrolisados da biomassa pré-tratada de arundo, maiores rendimentos de etanol foram obtidos quando a hidrólise enzimática foi realizada com carga enzimática de 15 FPU g⁻¹ e relação sólido:líquido 1:10 g mL⁻¹ em 8 horas de fermentação, enquanto que no processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), em batelada alimentada, maiores rendimentos de etanol foram obtidos com carga de sólidos de 200 g L⁻¹, e 25 FPU g⁻¹ na etapa de pré-hidrólise.

Em relação aos dois processos para obtenção de etanol testados, o processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) apresentou o dobro do rendimento médio

em volume de etanol por massa de arundo em relação ao processo de hidrólise e fermentação separadas (SHF).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Naik, S. N.; Goud, V. V.; Rout, P. K; Dalai, A. K. *Renew Sust Energ Rev.* **2010**, *14*, 578.
2. Hanghighi Mood, S.; Golfeshan, A. H.; Tabatabaei, M.; Jouzani, G. S.; Najafi, G. H.; Gholami, M.; Ardjmand, M. *Renew Sust Energ Rev.* **2013**, *27*, 77.
3. Luque, R.; Herrero-Davila, L.; Campelo, J. M.; Clark, J. H.; Hidalgo, J. M.; Luna, D.; Marinas, J. M.; Romero, A. A. *Energy Environ. Sci.* **2008**, *1*, 542.
4. BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), *Biocombustíveis*, disponível em www.anp.org.br (acesso 21/10/215).
5. Devarapalli, M.; Atiyeh, H. K. *Biofuel Res. J.* **2015**, 7268-280.
6. Barcelos, C. A.; Maeda, R. N.; Betancur, G. J. V.; Pereira Jr., N. *Braz J Chem Eng.* **2011**, *28*, 597.
7. Santos, F. A.; De Queiróz, J. H.; Colodette, J. L.; Fernandes, S. A.; Guimarães, Valéria M.; Rezende, S. T. *Quim. Nova.* **2012**, *35*, 1004.
8. Demirbas, M. F. *Appl. Energ.* **2009**, *86*, S151.
9. Shields, S.; Boopathy, R. *Int Biodeter Biodegr.* **2011**, *65*, 142.
10. Angelini, L. G.; Ceccarini, L.; Di Nasso, N. N.; Bonari, E. *Biomass Bioenerg.* **2009**, *33*, 635.
11. Lemons e Silva, C. F., Schirmer, M. A., Maeda, R. N., Barcelos, C. A., Pereira Jr, N. *Electron J Biotechn.* **2015**, *18*, 10.
12. Corno, L.; Pilu, R.; Adani, F. *Biotechnol Adv.* **2014**, *32*, 1535.
13. Scordia, D.; Cosentino, S. L.; Lee, J. W.; Jeffries, T. W. *Biomass Bioenerg.* **2011**, *35*, 3018.
14. Dias, J. M. C. S. In *Microrganismos na Produção de biocombustíveis Líquidos*; Machado, C. M. M. (Edt.); Embrapa: Brasília, 2013, p. 23.
15. Lopes, M. L.; Paulillo, S. C. L.; Godoy, A.; Cherubin, R. A.; Lorenzi, M. S.; Giometti, F. H. C.; Bernardino, C. D.; Neto, H. B. A.; Amorin, H. V. *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47S*, 64.
16. Basso, L. C.; Basso, T. O; Rocha, S. N. In: (2011). In: *Biofuel production - Recent Developments and Prospects*, Bernardes, M. A. dos S. (Edt.); InTech: Croatia, 2011, p. 85.
17. Biocombustíveis, *Cadernos FGV Energia*. Agosto 2017, 8, 120 p.

18. Raele, R.; Boaventura, J. M. G.; Fischmann, A. A.; Sarturi, G. *Technol Forecast Soc Change*. **2014**, *87*, 205.
19. Renovabio. Nota explicativa sobre a proposta de Criação da Política Nacional de Biocombustíveis. <http://www.mme.gov.br>. Acesso em 19/09/2017.
20. Ekman, A.; Wallberg, O.; Joelsson, E.; Börjesson, P. *Appl Energ*, **2013**, *102*, 299.
21. Paulova, L.; Patakova, P.; Branska, B.; Rychtera, M.; Melzoch, K. *Biotechnol Adv*. **2015**, *33*, 1091.
22. Dias, M. O. S.; Cunha, M. P.; Jesus, C. D. F.; Rocha, G. J. M.; Pradella, J. G. C.; Rossell, C. E.V.; Maciel Filho, R.; Bnomia, A. *Bioresour. Technol*. **2011**, *102*, 8964.
23. NovaCana. <https://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/etanol-celulosico-encruzilhada-gargalos-usinas-7-capacidade-310517>. Acesso em 14/07/2017.
24. <http://www.betarenewables.com/en/crescentino/here-comes-the-green-revolution>
25. <http://demoplants.bioenergy2020.eu>. Acesso em: 13/09/2017
26. Plano Decenal de Expansão de Energia 2026. <http://www.epe.gov.br/PDEE/Forms/EPEEstudo.aspx>. Acesso em: 04/07/2017.
27. Anwar, Z.; Gulfranz, M.; Irshad, M. J. *Radiat. Res. Appl. Sci*. **2014**, *7*, 163.
28. Choudhary, J.; Singh, S.; Nain, L. *Electron J Biotechn*. **2016**, *21*, 82.
29. Silva, R.; Haraguchi, S. K.; Muniz, E. C.; Rubira, A. F. *Quim. Nova*, **2009**, *3*, 661.
30. Rodrigues, D. S.; Mendes, T. D.; Pacheco, T. F. In *Microrganismos na Produção de biocombustíveis Líquidos*; Machado, C. M. M. (Edt.); Embrapa: Brasília, 2013, p. 145.
31. Chandel, A.K.; Chandrasekhar, G.; Radhika, K.; Ravinder, R.; Ravindra, P. *Biotechnol Mol Biol Rev*. **2011**, *6*, 008.
32. Morais, S. A. L.; Nascimento, E. A.; Melo, D. C.R. *Árvore*, **2005**, *29*, 461.
33. Kobayashi H.; Ohta. H.; Fukuoka, A. *Catal. Sci. Technol*. **2012**, *2*, 869.
34. Strassberger, Z.; Tanase, S.; Rothenberg, G. *RSC Adv*. **2014**, *4*, 25310.
35. Sannigrahi, P.; Pu, Y.; Ragauskas, A. *Curr Opin Environ Sustain*. **2010**, *2*, 383.
36. Zabed, H.; Sahu, J. N.; Suely, A., Boyce, A. N.; Faru, G. *Renew Sust Energ Rev*. **2017**, *71*, 475.
37. Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M.J. *Bioresour. Technol*. **2010**, *101*, 4851.
38. Scordia, D.; Cosentino, S. L.; Jeffries, T. W. *Ind Crops Prod*, **2013**, *49*, 392.
39. Castro, A. M.; Pereira Jr, N. *Quim. Nova*. **2010**, *33*, 181.
40. Ramos, L. P. *Quim. Nova*. **2003**, *26*, 863.

41. Chaturvedi, V.; Verma, P. *Biotech.* **2013**,3, 415.
42. Olofsson, K.; Bertilsson, M.; Lidén, G. *Biotechnol Biofuels*, **2008**, 1, 7.
43. Odega, T. L.; Petri, D. F. S. *Quim. Nova.* **2010**,33, 1558.
44. Boucher, J.; Chirat, C.; Lachenal, D. *Energ Convers Manage.* **2014**, 88, 1120.
45. Jensen, J. R.; Morinelly, J. E.; Gossen, K. R.; Brodeur-Campbell, M. J.; Shonnard, D. R. *Bioresour. Technol.***2010**,101, 2317.
46. Kim, J. K.; Lee, Y. Y.; Kim, t. H. *Bioresour. Technol.* **2016**, 199, 42.
47. Behera, S.; Arora, R.; Nandhagopal, N.; Kumar, S. *Renew Sust Energ Rev.* **2014**, 36, 91.
48. Singha, J.; Suhag, M.; Dhaka, A. *Carbohydr Polym.***2015**,117, 624.
49. Kim, J. K.; Lee, Y. Y.; Kim, t. H. *Bioresour. Technol.* **2016**, 199, 42.
50. Pacheco, T. F.; Machado, C. M. M.; Gonçalves, S. B. In *Microrganismos na Produção de biocombustíveis Líquidos*; Machado, C. M. M. (Edt.); Embrapa: Brasília, 2013, p. 213.
51. Guo, B.; Zhang, Y.; Guo, Y.; Lee, W. H.; Jin, Y. S.; Morgenroth, E. *Appl Biochem Biotechnol.***2013**, 169, 1069.
52. Wang, H.; Gao, H.; Lin, B.; Mu, X. *Adv Mat Res.***2013**, 724-725, 207.
53. Guilherme, A. A.; Dantas, P. V. F.; Santos, E. S.; Fernandes, F. A. N.; Macedo, G. R. *Braz. J. Chem. Eng.***2015**,32, 23.
54. Kumar, P.; Barrett, D. M.; Delwiche, M. J.; Stroeve, P. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, 48,3713.
55. Sindhu, R.; Binod, P.; Pandey, A. *Bioresour. Technol.***2016**, 199, 3.
56. Saritha, M.; Arora, A.; Lata. *Indian J Microbiol.* **2012**,52, 122.
57. Rana, V.; Eckard, A. D.; Ahring, B. K. *SpringerPlus.* **2014**, 3, 516.
58. Sun, Y.; Cheng, J. *Bioresour. Technol.* **2002**, 83, 1-11.
59. Saloheimo, M.; Paloheimo, M.; Hakola, S.; Pere, J.; Swanson, B.; Nyysönen, E.; Bhatia, A.; Ward, M.; Penttilä, M. *Eur. J. Biochem.*, **2002**,269, 4202.
60. Whitney, S. E. C.;Gidley, M. J.; McQueen-Mason, S. J. *Plant J*,**2000**,22, 327.
61. Quiroz-Castañeda, R. E.; Folch-Mallol, J. L.; *Biotechnol. Apl.*, **2011**, 28, 205.
62. Menon, V.; Rao, M. *Progress in Energy and Combustion Science.***2012**, 38, 522.
63. Gírio, F. M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R. *Bioresour Technol*, **2010**, 101, 4775.

64. Matsushika, A.; Inoue, H.; Kodaki, T.; Sawayama, S. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2009**, *84*, 37.
65. Parachin, N. S.; Almeida, J. R. M. In *Microrganismos na Produção de biocombustíveis Líquidos*; Machado, C. M. M. (Edt.); Embrapa: Brasília, 2013, p. 189.
66. Zhao, X. Q.; Zi, L. H.; Bai, F. W.; Lin, H. L.; Hao, X. M.; Yue, G. J.; Ho, N. W. Y. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* **2012**, *128*, 25.
67. Pilu, R., Bucci, A., Badone, F. C., Landoni, M. *Afr. J. Biotechnol.*, **2012**, *11*, 9163.
68. Shatalov, A.; Pereira, H. *BioResources.* **2003**, *1*, 45.
69. Fiore, V.; Scalici, T.; Valenza, A. *Carbohydr Polym*, **2014**, *106*, 77.
70. Amaducci, S.; Perego, A. *Ind Crop Prod.* **2015**, *75*, 122.
71. Barana, D.; Salanti, A.; Orlandi, M.; Ali, D. S.; Zoia, L. *Ind Crop Prod.* **2016**, *86* 31.
72. Borin, M.; Barbera, A. C.; Milani, M.; Molari, G.; Zimbone, S. M.; Toscano, A. *Europ. J. Agronomy.* **2013**, *51*, 117.
73. Bura, R.; Ewanick, S.; Gustafson, R. *Tappi J.* **2012**, *11*, 59.
74. Seca, A. M. L.; Cavaleiro, J. A. S.; Domingues, F. M. J.; Silvestre, A. J. D.; Evtuguin, D.; Pascoal Neto, C. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 817.
75. Amaducci, S.; Perego, A. *IndCropProd.* **2015**, *75*, 122.
76. Jeon, Y. J.; Xun, Z.; Rogers, P. L. *Lett. Appl. Microbiol.* **2010**, *51*, 518.
77. Loaces, I.; Schein, S.; Noya, F. *Bioresour. Technol.* **2017**, *224*, 307.
78. Vasconcelos, G. C.; Costa Gomes, J. C.; Corrêa, L. A. V. *Rendimento de biomassa da cana-do-reino (Arundo donax L.)* Embrapa: Pelotas, 2007, 25 p.
79. Simões, K. K. C., *Ocorrência e caracterização da espécie invasora Arundo donax L. (CANA-DO-REINO) no Distrito Federal, Brasil* (Dissertação de Mestrado), Universidade de Brasília, Brasil, 2013.
80. Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, A.; Sluiter, J.; Templeton, D. **Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples**, Laboratory Analytical Procedure, NREL/TP-510-42621, 2008.
81. Sluiter, A.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Templeton, D. **Determination of Extractives in Biomass**, Laboratory Analytical Procedure, NREL/TP-510-42619, 2005.
82. Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Templeton, D.; Crocker, D. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass**, Laboratory Analytical Procedure, NREL/TP-510-42618, 2008.

83. Adney, B.; Baker, J. **Measurement of Cellulase Activities**, Laboratory Analytical Procedure, NREL/TP-510-42628, 2008.
84. Maeda, R. N.; Barcelos, C. A.; Santa Anna, L. M. M.; Pereira Jr., N. *J. Biotechnol.* **2013**, *163*, 38.
85. Hendriks, A.T.W.M.; Zeeman, G. *Bioresource Technol.* **2009**, *100*, 10.
86. Chiamonti, D.; Prussi, M.; Ferrero, S.; Oriani, L.; Ottonello, P.; Torre, P.; Cherchi, F. *Biomass Bioenerg.* **2012**, *46*, 25.
87. Vidal Jr., B. C.; Dien, B. S.; Ting, K. C.; Singh, V. *Appl Biochem Biotechnol.* **2011**, *164*, 1405.
88. Phitsuwan, P.; Sakka, K.; Ratanakhanokchai, K. *Biomass Bioenerg.* **2013**, *58*, 390.
89. Hsu, T. C.; Guo, G. L.; Chen, W. H.; Hwang, W. S. *Bioresource Technol.* **2010**, *101*, 4907.
90. Barcelos, C. A.; Maeda, R. N.; Betancur, G. J. V.; Pereira Jr, N. *Waste Biomass Valor*, **2013**, *4*, 341.
91. Kristensen, J. B.; Felby, C.; Jorgensen, H. *Biotechnol Biofuels*, **2009**, *2*, 11.
92. dos Santos, J. R. A.; Souto-Maior, A. M.; Gouveia, E. R.; Martín, C. *Quim. Nova*, **2010**, *33*, 904.
93. Gupta, R.; Sharma, K. K.; Kuhad, R. C. *Bioresour Technol.* **2009**, *100*, 1214.
94. Ask, M.; Olofsson, K.; Di Felice, T.; Ruohonen, L.; Penttilä, M.; Lidén, G.; Olsson, L. *Process Biochem*, **2012**, *47*, 1452.
95. Mohd Azhar, S. H.; Abdulla, R.; Jambo, S. A.; Marbawi, H.; Gansau, J. A.; Faik, A. A. M.; Rodrigues, K. F.; *Biochem Biophys Rep.* **2017**, *10*, 52.

ANEXO A - Curvas de calibração dos analitos avaliados

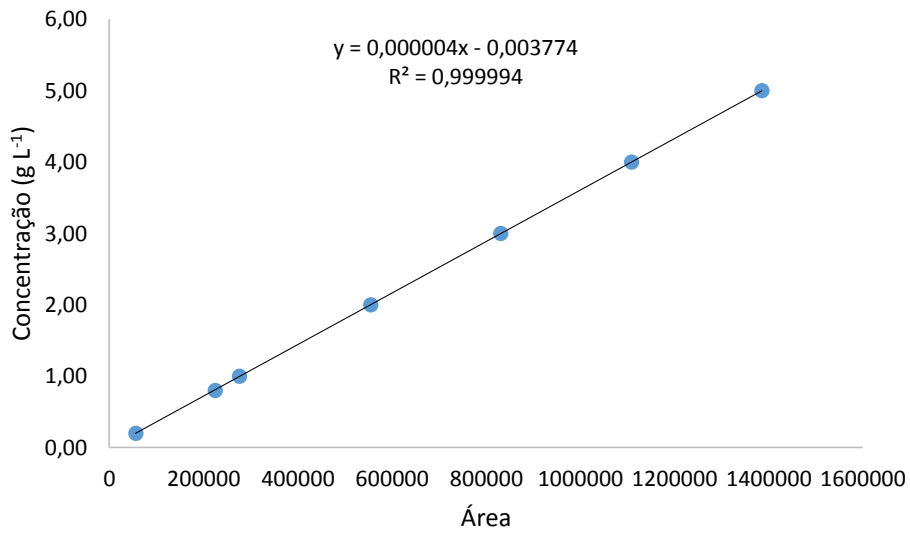


Figura A1. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) para glicose.

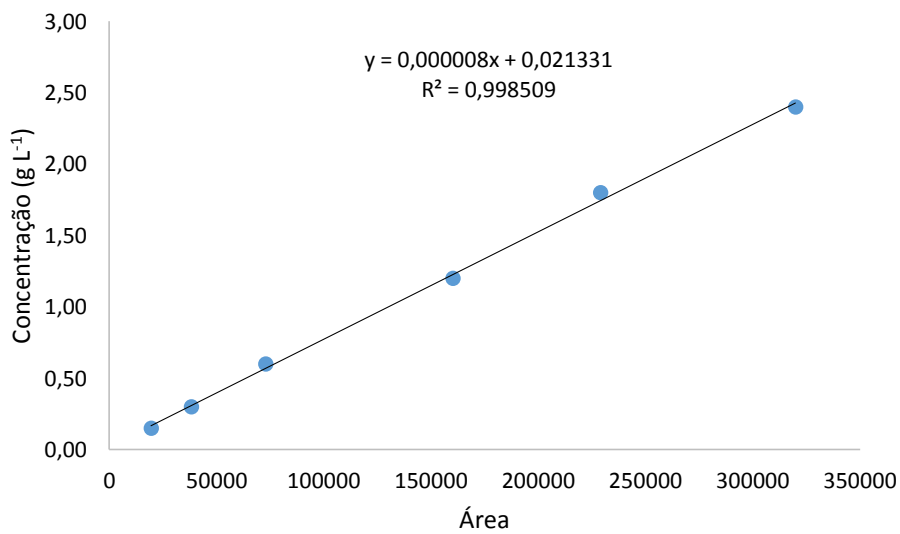


Figura A2. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) para ácido acético.

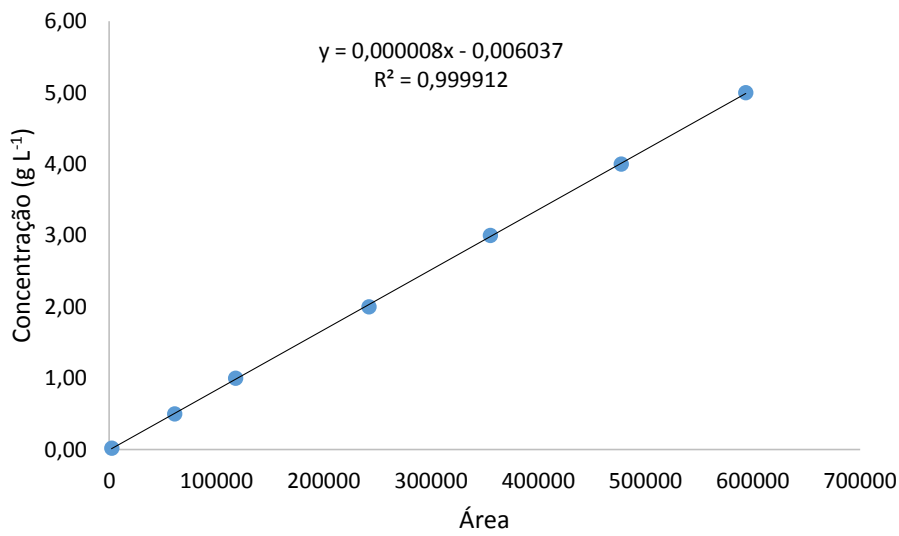


Figura A3. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) para etanol.

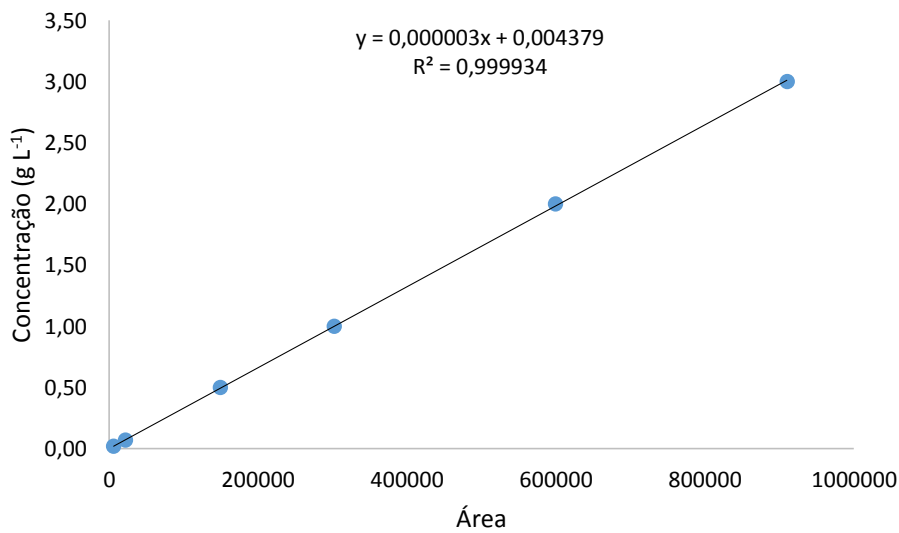


Figura A4. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) para celobiose.

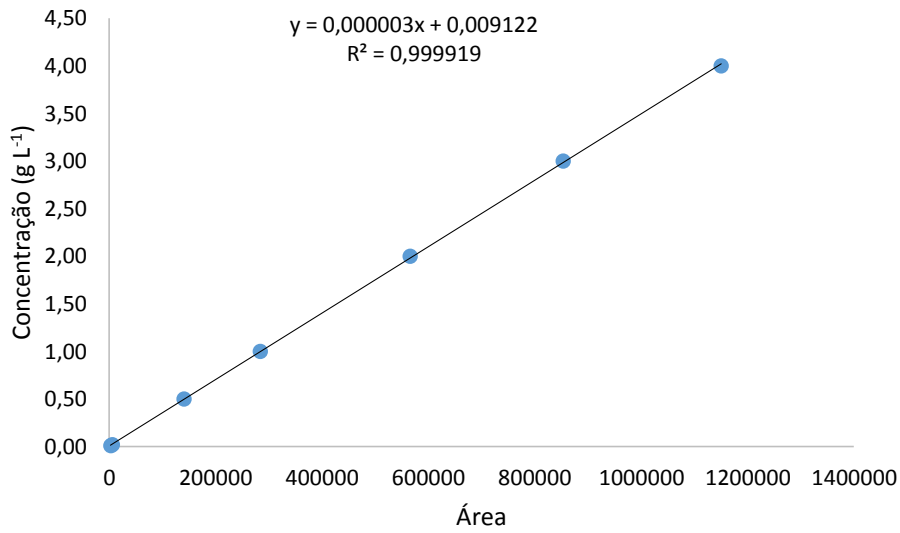


Figura A5. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) para xilose.

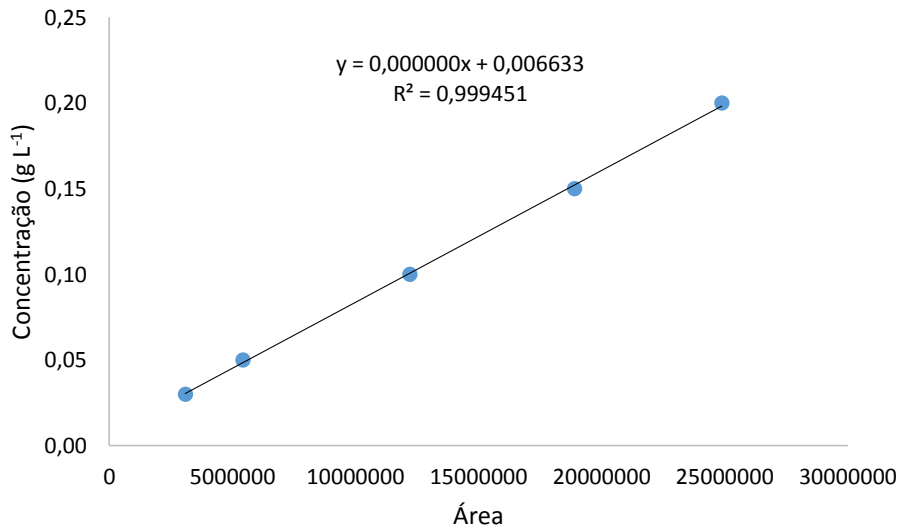


Figura A6. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) para HMF.

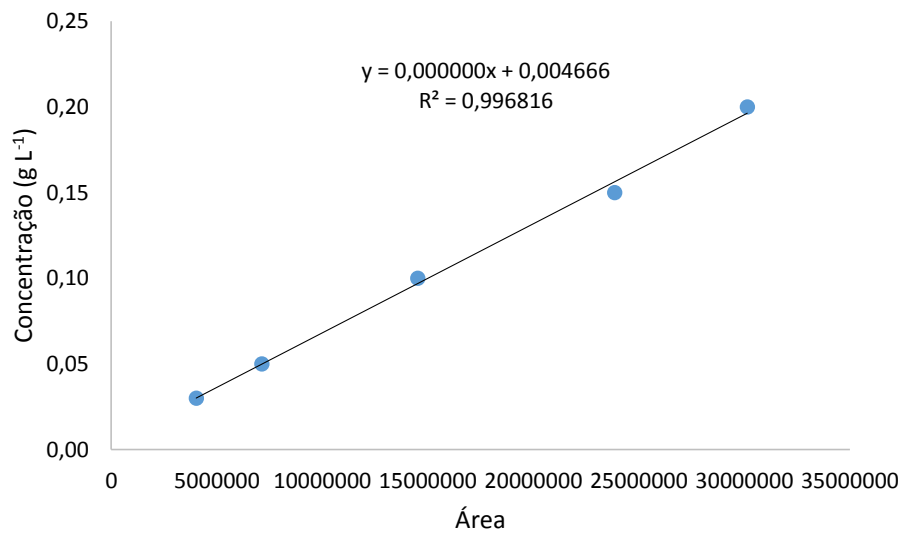


Figura A7. Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) para furfural.

ANEXO B - Cromatogramas

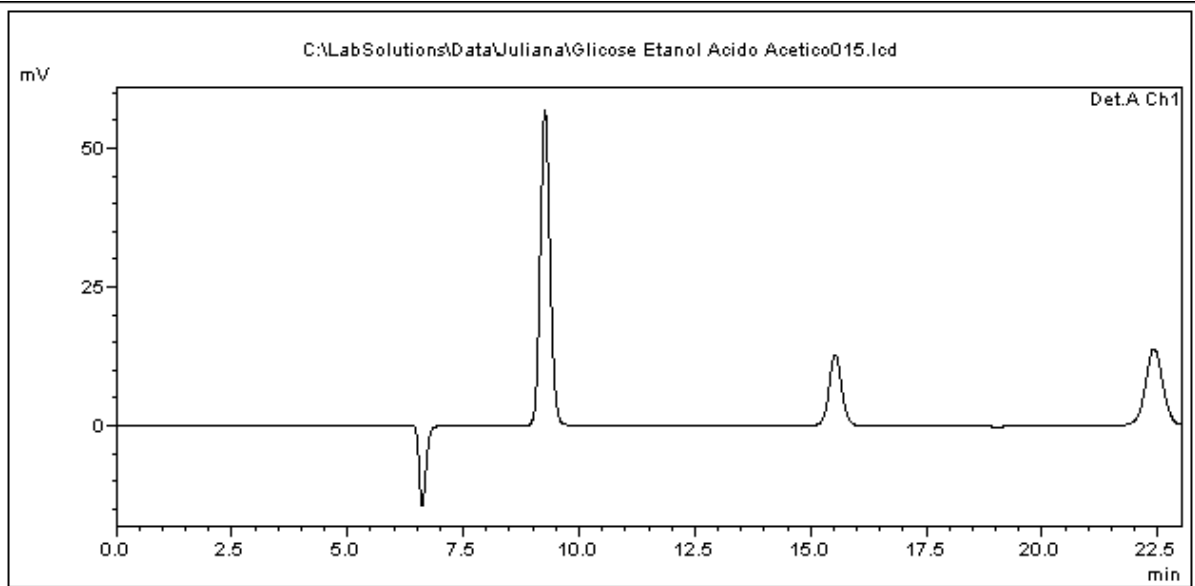


Figura B1. Cromatograma curva de calibração dos padrões de glicose, ácido acético e etanol.

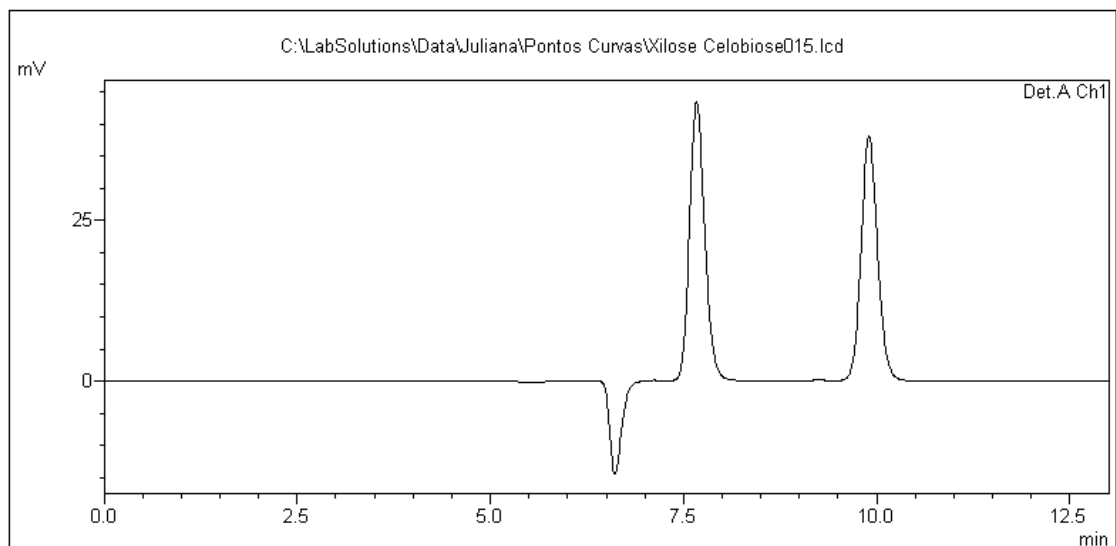


Figura B2. Cromatograma curva de calibração dos padrões de xilose e celobiose.

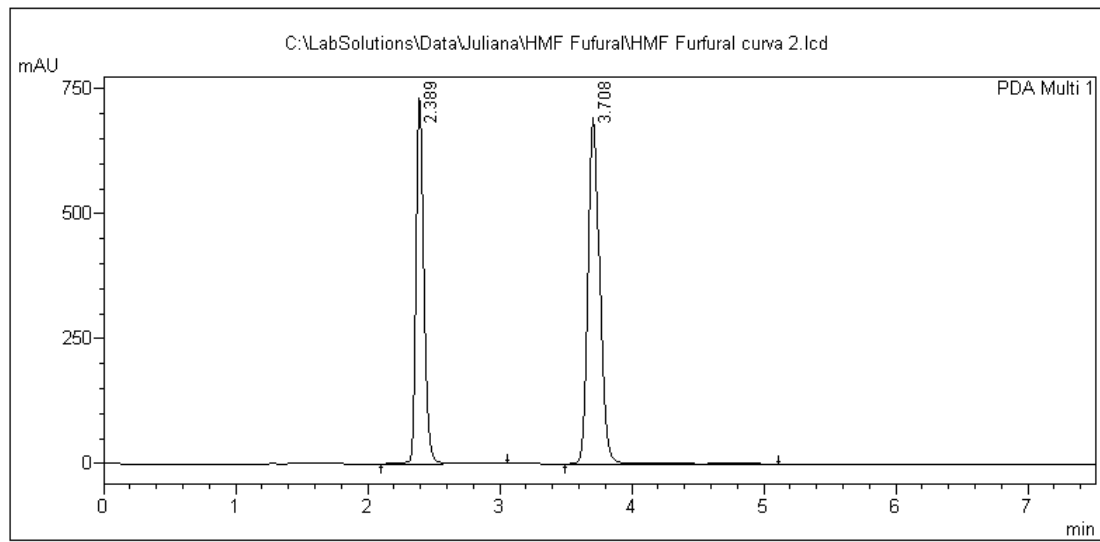


Figura B3. Cromatograma curva de calibração dos padrões de HMF e fufural.